

**UNTERSUCHUNGEN ZUR LÖSUNG UND KNÜPFUNG
DER GALLENFARBSTOFF-AOPROTEIN-BINDUNG AM
BEISPIEL VON C-PHYCOCYANIN AUS SPIRULINA
MAXIMA UND AN MODELLVERBINDUNGEN**

EVA SCHROPP

Untersuchungen zur Lösung und Knüpfung der Gallen-
farbstoff-Apoprotein-Bindung am Beispiel von C-
Phycocyanin aus *Spirulina maxima* und an Modellver-
bindungen

Dissertation
der
Fakultät für Biologie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Eva Schropp
aus Passau

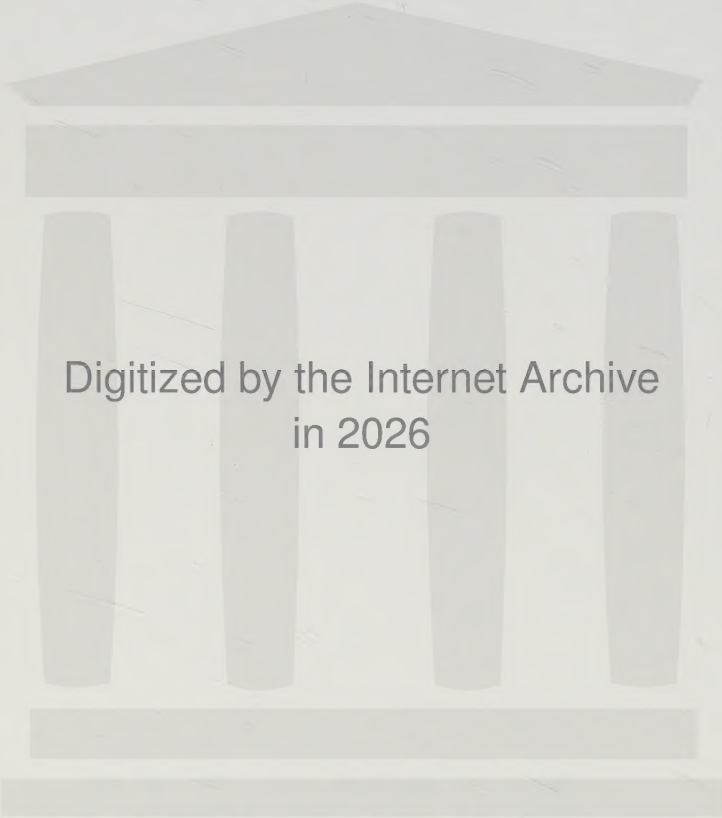
Oktober 1986

Tag der mündlichen Prüfung: 28.1.1987

1. Berichterstatter: PD Dr. H.P. Köst

2. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Rüdiger

Meinen Eltern und Mike



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554822_0085

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Privatdozent Dr. H.-P. Köst am Botanischen Institut der Universität München angefertigt.

Herrn Privatdozent Dr. H.-P. Köst danke ich herzlich für die Themastellung, seine vielfältigen Anregungen sowie für seine stete Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. W. Rüdiger danke ich für sein Interesse an dieser Arbeit und für anregende Diskussionen.

Herrn Prof. Dr. W. Schäfer (Max-Planck-Institut, Martinsried) sei herzlich für die Aufnahme der FAB-Massenspektren bedankt.

Nicht zuletzt möchte ich all jenen Freunden und Kollegen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Insbesondere gilt mein Dank auch Herrn Dr. J. Eder (Max-Planck-Institut, Martinsried) für die Immunisierung der Kaninchen sowie die Darstellung der einzelnen Seren. und ganz besonders für die wertvollen Tips bezüglich der Arbeit mit Antikörpern.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft sei für die finanzielle Unterstützung gedankt.

ABKÜRZUNGEN

A, CEC, TE, TEC, TEH ⁺	Fließmittel, Zusammensetzung vgl. 110 f.
ALA	5-Aminolaevulininsäure
APC	Allophycocyanin
α-Substituent-PCBdme	R- oder S- konfigurierte 3'-A-Di- hydromesobiliverdin,
DC	Dünnschichtchromatographie, hier aufsteigend auf Kieselgel G
Edta	Ethylendiamintetraacetat
FAB	Fast atom bombardement-Massenspektrum
HCl-PCBdme	durch Abspaltung mit HCl aus Phyco- cyanin erhaltenes Bilin
IEP	Isoelektrischer Punkt
IF	Isoelektrische Fokussierung
Methanol-Co	bei der Abspaltung mit HCl von Phy- cyanin entstehendes mit PCBdme chromatographierendes Pigment
MCIS	1-Methyl-2-(2-Chlor-ethyl)-Succinimid
MAES	1-Methyl-2-Ethyliden-Succinimid
MEM	1-Methyl-2-Ethyl-maleinimid
MEsS	1-Methyl-2-(2-sulfonyl-ethyl)Succinimid
PC	Phycocyanin
PCBdme	Phycocyanobilin, dme = dimethylester
PE	Phycocerythrin
PEB	Phycocerythrobilin
PEPC	Phycocerythrobilinchromopeptide
TMB	Tetramethylbenzidin
TFA	Trifluoressigsäure
Praefixe	
E-	E-konfiguration an der exocyclischen Doppelbindung
Z-	Z-Konfiguration an der exocyclischen Doppelbindung
R-	R-Konfiguration am C2' bei gleichzei- tiger R-Konfiguration an C1 und C2
S-	S-Konfiguration am C2' bei gleichzei- tiger R-Konfiguration an C1 und C2
α*	Konfigurationstyp bei Imiden: RRR oder SSS an C1, C2, C2'
β*	Konfigurationstyp bei Imiden; RRS oder SSR an C1, C2 und C2'.

INHALTSVERZEICHNIS

SEITE

I.	Einleitung	
1.	Vorkommen, chemische Natur und Bedeutung von Gallenfarbstoffen.....	1
1.1.	Vorkommen von freien Gallenfarbstoffen.....	1
1.2.	Vorkommen von proteingebundenen Gallenfarb- stoffen bei Autotrophen.....	2
1.2.1.	Phytochrom.....	3
1.2.2.	Phycobiliproteine: Phycocyanin, Allophycocyanin und Phycoerythrin.....	3
1.2.2.1.	Der Chromophor der Phycobiliproteide.....	4
1.2.2.2.	Biosynthese der Phycobiliproteide.....	7
1.2.2.3.	Abbau der Phycobiliproteide.....	9
2.	Problemstellung.....	10
3.	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	11
II.	Ergebnisse und Diskussion.....	14
1.	Struktur und Eigenschaften des mit HCl aus Phycocyanin abgespaltenen Bilins (= HCl-Chromophor).....	14
1.1.	Darstellung des HCl-Chromophors bzw. des Ethyliden-Phycocyanobilins.....	14
1.1.1.	Darstellung und Reinigung von Methyl- Ethyliden-PCBdme (E-konfiguriert).....	14
1.1.2.	Darstellung, Reinigung und Eigenschaften von HCl-PCBdme.....	15
1.1.2.1.	Chromatographische Eigenschaften von HCl-PCBdme.....	16
1.1.2.2.	Spektrophotometrische Daten von HCl-PCBdme und Modelle.....	17

1.2.	Chromsäure und Chromatabbau von HCl-PCBdme...	20
1.2.1.	Ergebnisse des Chromsäureabbaus von HCl-PCBdme	22
1.2.2.	Ergebnisse des Chromatabbaus: Nachweis der Ringanordnung ABCD.....	23
1.3	Strukturaufklärung des Imides hRF 48 aus HCl-PCBdme.....	24
1.3.1.	Ausschluß einer Doppelbindung in dem Imid hRF hRF 48.....	24
1.3.2.	Identifizierung des Imides hRF 48 als 3-Methyl-2-(2-Chlor-ethyl)-Succinimid MClS.....	24
1.3.1.1.	Synthese der diastereomeren α -Chlor-Succinimide.....	24
1.3.2.2.	Chromatographische Eigenschaften der diastereomeren Chlorsuccinimide im Vergleich mit dem Imid hRF 48.....	26
1.3.2.2.	Eliminierung von HCl aus den diastereomeren Succinimiden und dem Imid hRF 48.....	27
1.3.2.3.1.	Eliminierung von HCl in methanolischem Ammoniak.....	27
1.3.2.3.2.	Eliminierung von HCl in wässrigem Ammoniak und analytische Eliminierung.....	27
1.4.	Massenspektrum von S-konfiguriertem α -Chlor-PCBdme und E-PCBdme.....	31
1.5.	Identifikation von Methanol-Co als C3'-R-konfigurierter α -Chlor-PCBdme.....	
1.5.1.	Chromatographische Eigenschaften.....	31
1.5.2.	Spektraldaten von Methanol-Co.....	32
1.5.3.	Chromsäureabbau von Methanol-Co.....	33

1.5.3.1.	Chromsäureabbau von in Fließmittel A gereinigtem "Methanol-Co".....	33
1.5.3.2.	Chromsäureabbau von in Fließmittel TE gereinigtem "Methanol-Co".....	36
1.6.	Abschätzung der Mengenverhältnisse von R- und S- konfiguriertem α -Chlor-PCBdme.....	36
1.7.	Ausschluß eines angularen Chlorsubstituenten	38
1.8.	Überlegungen und Versuche zum Reaktionsablauf: Diskussion von Substitutions- und Eliminations-Additionsmechanismus.....	40
1.8.1.	Diskussion der möglichen Reaktionsmechanismen unter Einbeziehung der stereochemischen Konsequenzen.....	40
1.8.1.1.	Substitutionsmechanismen.....	42
1.8.1.2.	Eliminationsmechanismus.....	43
1.8.1.3.	Vergleich der Wahrscheinlichkeiten für Elimination und Substitution.....	44
1.8.1.4.	Strukturelle Konsequenzen der verschiedenen Reaktionsmechanismen.....	44
1.8.1.5.	Addition von HCl an E-PCBdme.....	45
1.9.	Umlagerung der diastereomeren α -Chlor-PCBdme zu Z- und E-PCBdme.....	48
1.9.1.	Chromsäureabbau eines HCl-Rohextraktes.....	48
1.9.2.	Umlagerung der α -Chlor-PCBdme während der DC.....	50
1.9.3.	Präparative Eliminierung der diastereomeren α -Chlor-PCBdme zu Z- und E-PCBdme.....	53
1.9.3.1.	Versuch der Eliminierung mit ammoniakalischem Ammoniak.....	53
1.9.3.2.	Nachweis von E-PCBdme als Eliminierungsprodukt von S-konfiguriertem Chlor-PCBdme.....	54

1.9.3.3.	Nachweis von Z- und E-PCBdme als Eliminierungsprodukte von S-Chlor-PCBdme.....	56
1.10.	Identifikation des grünen Pigmentes.....	58
1.11.	Abspaltung der Biline mit HCl- bzw. HBr-Gas.....	62
1.11.1.	Abspaltung der Biline mit HCl-Gas.....	62
1.11.2.	Abspaltung der Chromophore mit HBr-Gas....	63
1.12.	Untersuchung des durch HCl abgespaltenen Proteins mittels SDS-Elektrophorese.....	66
2.	Darstellung von Bilinthioether.....	69
2.1.	Addition von Ethylmerkaptan an PCBdme.....	69
2.1.1.	Darstellung der PCBdme-Thioether.....	69
2.1.2.	Chromatographie und Absorptionsspektroskopie der gereinigten Biline.....	71
2.1.3.	Beweis der Thioaddition.....	73
2.1.3.1.	Ausschluß einer Methanoladdition.....	73
2.1.3.2.	Beweis der Addition von Ethylmerkaptan durch Massenspektroskopie.....	73
2.1.3.3.	Nachweis einer regioselektiven Thioladdition an Ring A.....	75
2.1.4.	Diskussion der Additions geschwindigkeit...	78
2.2.	Addition von Merkapt ethanol.....	81
2.2.1.	Darstellung von Hydroxyethyl-Thio-PCBdme...	81
2.2.2.	Chromatographische Eigenschaften der Additionsprodukte.....	81
2.2.3.	Spektrale Eigenschaften der Additionsprodukte.....	82
2.2.4.	Chromsäureabbau der Additionsprodukte.....	83
2.2.5.	Massenspektroskopie der Additionsprodukte	85

2.2.6.	Schlußfolgerung und Diskussion bezüglich der Biosynthese von Biliproteinen..	87
2.3.	Spaltung der diastereomeren α -Ethylthio-PCBdme mit HCl.....	89
2.3.1.	Spektrale und dünnschichtchromatographische Analyse des Abspaltungsgemisches...	89
2.3.2.	Chromsäureabbau der Abspaltungsgemische..	90
3.	Isoelektrische Fokussierung von Gallenfarbstoffen.....	91
3.1.	Ergebnisse der Isoelektrischen Fokussierung.....	92
3.1.1.	IEP und Spektraldaten der fokussierten Biline.....	92
3.2.	Ermittlung des Pyrrolenin-pKa der Biline mit IEP 4,15 und 4,3.....	96
3.3.	Ermittlung des mittleren pKa-Wertes der Propionsäureseitenketten.....	96
4.	Untersuchung zur immunogenen Wirkung des Bilinchromophors.....	98
4.1.	Immunisierung der Kaninchen mit Phycoerythrinpeptid-Konjugaten.....	99
4.2.	Ausschluß von Haptenspezifischen Antikörpern.....	100
5.	Untersuchung auf pyrrolische Substanzen im Medium von <u>Synechococcus 6301</u>	103
5.1.	Nachweis von benzidinpositiven Substanzen im Medium.....	103
5.2.	Inkubation von PCBdme und Methylphaeophorbid unter photooxidativen Bedingungen	105
5.3.	Inkubation von PCB in "Schwefelmangelmedium".....	106

EXPERIMENTELLER TEIL

SEITE

6.	Allgemeine Vorbermerkungen.....	107
6.1.	Geräte, Chemikalien und Algenanzuchtmedien...	107
6.2.	Arbeiten mit Bilinen, Bilindme, Bilipep- tiden und Biliproteinen.....	109
6.3.	Dünnschichtchromatographie.....	109
6.3.1.	Durchführung der DC.....	109
6.3.2.	Präparative DC.....	110
6.3.3.	Analytische DC.....	110
6.4.	Fließmittel für die DC.....	110
6.4.1.	Fließmittel für die DC von Bilindme.....	110
6.4.2.	Fließmittel für die DC von Imiden.....	111
6.4.	Lösungsmittel für die UV-Vis-Spektroskopie...	112
7.	Struktur des durch Abspaltung mit HCl aus PC erhaltenen Bilins (=HCl-PCBdme).....	112
7.1.	Abspaltung des Bilins mit Methanol: Darstel- lung von PCB.....	112
7.2.	Abspaltung des Bilins mit HCl konz.: Darstel- lung von HCl-PCB.....	113
7.2.1.	Reinigung von PC aus <u>Spirulina platensis</u>	113
7.2.2.	Abspaltung des Bilinchromophors mit HCl.....	114
7.2.2.1.	Ermittlung der optimalen Zeit und Tempera- tur für die Bilinabspaltung mit HCl konz....	114
7.2.2.2.	Präparativer Ansatz ($PC \geq 0,5g$).....	115
7.2.2.3.	Präparativer ($PC < 0,5g$) und analytischer Ansatz.....	116
7.3.	Veresterung der Chromophore.....	116
7.3.1.	Präparativer Ansatz (Veresterungsgemisch ≥ 10 ml).....	116
7.3.2.	Ansatz mit Veresterungsgemischen < 10 ml.....	116

7.4.	Reinigung der Bilindme.....	117
7.4.1.	Vorreinigung auf Kieselgel-G-Platten.....	117
7.4.2.	Reinigung auf HPTLC-Platten.....	117
7.4.3.	Elution der Bilindme.....	117
7.4.4.	Chromatographische Eigenschaften der isolier- ten Bilindme und UV-VIS-Daten.....	118
7.5.	Chromsäure- und Chromatabbau von HCl-PCBdme.....	119
7.5.1.	Analytischer Chromsäureabbau auf der Platte.....	119
7.5.2.	Präparativer Chromsäureabbau im Reagenzglas.....	119
7.5.2.1.	Reinigung der durch Chromsäureabbau erzeugten Imide.....	119
7.5.2.2.	Ergebnisse des Chromsäureabbaus von HCl-PCBdme..	120
7.5.3.	Chromatabbau von HCl-PCBdme.....	120
7.5.4.	Visualisierung der Imide.....	121
7.5.4.1.	Visualisierung mit Tetramethylbenzidin.....	121
7.5.4.2.	Visualisierung mit Kaliumpermanganat.....	121
7.5.4.3.	Visualisierung mit UV-Licht.....	121
7.5.5.	Visualisierung der Pyrrolaldehyde.....	122
7.6.	Darstellung von Referenzimiden.....	122
7.6.1.	Interner Standard.....	122
7.6.2.	Methylvinylmaleinimid (MVM).....	122
7.6.3.	Hämaminsäureimidmethylester, Methyl ethylmalein- imid und Methyl ethylidensuccinimid.....	122
7.6.4.	Präparation der diastereomeren α -Chlor-Succin- imide (MCLS).....	122
7.7.	Ausschluß einer Doppelbindung im Imid hRF 48...	123
7.8.	Eliminationsreaktionen der diastereomeren α - -Chlor-Succinimide und des Imids mit hRF 48.....	123
7.8.1.	Präparative Eliminierung mit Ammoniak.....	123

7.8.2.	Analytische Eliminierung mit Ammoniakgas.....	124
7.9.	FAB-Spektrum von S-Chlor-PCBdme.....	124
7.10.	Identifikation von Methanol-Co als R-konfiguriertes α -Chlor-PCBdme.....	125
7.11.	Abschätzung der Mengenverhältnisse der diastereomeren α -Chlorchromophore...-	126
7.13.	Chromsäureabbau eines HCl-Rohextraktes.....	127
7.14.	Sorbenskatalysierte Umlagerung der diastereomeren Chlor-PCBdme zuden Ethyliden-PCBdme.....	127
7.14.1.	Beweise für die Eliminierung.....	127
7.14.2.	Nachweis der spezifischen Umlagerungsprodukte.	128
7.14.2.1.	Versuch der Eliminierung mit verdünntem NH_3 ..	128
7.14.2.2.	"Präparative" sorbenskatalysierte Eliminierung	128
7.14.2.3.	Nachweis von Z-PCBdme als Umlagerungsprodukt von S-Chlor-PCBdme.....	129
7.15.	Versuchte Identifikation eines weiteren, grün-gefärbten Gallenfarbstoffdme.....	130
7.15.1.	Oxidative Aufarbeitung eines HCl-Rohextraktes.	130
7.15.3.	Darstellung von α -Brom-Maleinimid/Methoxymaleinimid.....	130
7.16.	Abspaltung des Phycocyaninchromophors mit gasförmigem HCl bzw. HBr.....	131
7.17.	Untersuchung des Apoproteins.....	132
7.17.1.	Elektrophorese des Apoproteins.....	132
8.	Darstellung von PCBdme-Thioethern.....	132
8.1.	Versuchte Substitution von α -Brom-PCBdme mit Sulfid.....	132
8.2.	Addition von SH-Verbindungen an PCBdme.....	133
8.2.1.	Addition von Ethylmerkaptan an PCBdme.....	133
8.2.2.	Chromatographie der Ethylmerkaptan-PCBdme.....	133

8.2.3.	UV-VIS-Spektren der Bilindme mit hRF 79 bzw. 74.....	134
8.2.4.	Chromsäureabbau der Bilindme mit hRF 79 79 bzw. 74.....	134
8.2.4.1.	Darstellung der diastereomeren Sulfonyl- succinimide und ihre Reinigung.....	134
8.2.4.2.	Chromsäureabbau der Bilindme.....	135
8.2.4.3.	Inkubation der Bilindme in 6% H ₂ SO ₄ /Me- thanol.....	135
8.3.	Darstellung von Mercaptoethanol-PCBdme und dessen Eigenschaften.....	135
8.3.1.	Darstellung von Mercaptoethanol-PCBdme in wässrigem bzw. methanolischem :NH ₃	135
8.3.2.	Chromatographie der Bilindme.....	135
8.3.3.	UV-VIS-Spektren der Bilindme.....	136
8.3.4.	FAB-Spektren der Bilindme.....	136
8.3.5.	Chromsäureabbau der Bilindme.....	136
8.4.	Spaltung der diastereomeren Ethylthio- PCBdme mit HCl.....	136
9.	Isoelektrische Fokussierung von Gallen- farbstoffen.....	137
9.1	Abspaltung der Chromophore.....	137
9.1.1.	Abspaltung mit Salzsäure.....	137
9.1.2.	Abspaltung durch Methanol.....	137
9.2.	Durchführung der IF.....	137
9.2.1.	Technische Daten zur Fokussierung.....	137
9.2.2.	Analyse der fokussierten Gallenfarbstoffe	138
9.2.3.	Titrationsskurven nach Righetti.....	138
9.2.4.	Spektroskopische Titration.....	139

10.	Untersuchungen zur Haptenwirkung von kurzkettigen Biliptiden am Beispiel von Phycoerythrin-Peptiden.....	141
10.1.	Immunisierung der Kaninchen mit gekoppel- ten Phycoerythrinpeptiden.....	141
10.1.1.	Präparation der Phycoerythrinpeptide.....	141
10.1.2.	Kopplung der PE-Peptide an einen Träger....	141
10.1.2.3.	Kopplung an Haemocyanin.....	141
10.1.2.2.	Kopplung an CNBr-aktivierte Sepharose....	142
10.1.2.	Immunisierung der Kaninchen mit dem PE- Konjugat.....	142
10.2.	Ausschluß von PE-Peptid-spezifischen Anti- körpern.....	143
10.2.1.	Immunologische Versuche mit ^{12}C -PE-Peptid	143
10.2.1.1.	Nachweis HC-spezifischer Antikörper im Ouchterlony-Test.....	143
10.2.1.1.	Versuchter Nachweis von PE-Peptidspezifi- schen Antikörpern.....	143
10.2.2.	Immunologische Versuche mit ^{14}C -PE-Peptid	145
10.2.2.2.	Darstellung von ^{14}C -PE-Peptid.....	145
10.2.2.2.1.	Anzucht von <u>P. cruentum</u> in ^{14}C -Medium....	145
10.2.2.2.2.	Bestimmung der ^{14}C -Aufnahme durch die Al- gen und Zellzahlbestimmung.....	146
10.2.2.2.3.	Darstellung von ^{14}C -Phycoerythrin-Peptid. .	148
10.2.3.	Test der Antiseren mit ^{14}C -PE-Peptid durch Radioaktivitätsmessung des Überstandes nach Postpräzipitation mit Antikaninchen-IgG....	150
10.2.3.1.	Bestimmung der optimalen Anti-IgG-Menge für die Postpräzipitation.....	150
10.2.3.2.	Test der Antiseren mit ^{14}C -PE-Peptid.....	153

11.	Nachweis von pyrrolischen Substanzen im Medium von <u>Synechococcus 6301</u>	154
11.1.	Anzucht der Algen.....	154
11.2.	Gewinnung des Extraktes.....	154
11.3.	2-dimensionale DC: Chromatographie der Pigmente und der Chrmsäureabbauprodukte..	154
11.4.	Vergleich von verestertem und unverester- tem Extrakt uns Nullproben.....	154
11.5.	Inkubation von Methylphaeophorbid und PCBdme unter photooxidativen Bedingungen..	155
11.6.	Inkubation von PCB in Schwefelmangel- medium.....	156
III.	Literaturliste.....	157

I. Einleitung

1. Vorkommen, chemische Natur und Bedeutung von Gallenfarbstoffen
- 1.1. Vorkommen von freien Gallenfarbstoffen

Unter Gallenfarbstoffen versteht man lineare, offenkettige Tetrapyrrole (vgl. Abb. 1 als Grundgerüst), wobei die Pyrrolkerne über Methin oder Methylen-Brücken verknüpft sind. Da die Tetrapyrrole durch oxidative Ringöffnung aus den Porphyrinen entstehen (Buttersby et al., 1975) tragen die Gallenfarbstoffe an den Endringen, Position 1 bzw. 19 (vgl. Abb. 1) jeweils eine Sauerstofffunktion. Bedingt durch ihr ausgedehntes π -Elektronensystem absorbieren die Gallenfarbstoffe im sichtbaren Bereich, wobei das Absorptionsmaximum in etwa linear mit der Zahl der Doppelbindungen verknüpft ist (Köst, 1974).

Verschiedenste Tetrapyrrole finden sich sowohl bei Tieren als auch bei Pflanzen; sie gehören größtenteils der α -Reihe an. Die Präfixe α , β , γ und δ bezeichnen dabei die Stelle im Porphyrin, an der die Ringöffnung stattgefunden hat, d.h. die Anordnung der Pyrrolkerne mit ihren Substituenten (Pfeile in Abb. 1 b bezeichnen die möglichen Orte der oxidativen Ringspaltung). Eine Ausnahme bilden die Schmetterlinge, bei denen sich auch Tetrapyrrole der γ -Reihe finden (Rüdiger, 1969; Bois-Choussy und Barbier, 1978; Barbier, 1981). Als Endprodukte des Haemabbaus werden die Tetrapyrrole bei Tieren entweder ausgeschieden, oft in reduzierter Form als Bilirubin in der Gallenflüssigkeit oder als Stercobiline im Kot (Faller, 1978) oder in Geweben bzw. Körperflüssigkeiten abgelagert, so z.B. neben Schmetterlingen bei Spinnen (Holl und Rüdiger, 1975), Schnecken (Ogata et al. 1979; Benedikt et al. 1986) auch in Vogeleiern (z.B. der Amsel, Köst und Benedikt 1981). In den allermeisten Fällen sind die bei Tieren vorkommenden Tetrapyrrole nicht kovalent an Proteine gebunden, sondern nur mit ihnen assoziiert, so z.B. der Transportkomplex Bilirubin - Serumalbumin (Karlson, 1972) oder Aplysioviolins (Rüdiger, 1967). Nur für Fische, z.B. bei Scarus gib-

bus Rüppell ist eine kovalente Bindung zwischen (Halbmeso)Biliverdin und Protein über einen Cystein-Thioether beschrieben (Yamaguchi et al. 1977), bei Crenilabrus-Blau (aus Crenilabrus pavo) wurde eine Bindung an das Protein über Ring A und C nachgewiesen (Rüdiger et Abolins, 1969). Die Funktion der Tetrapyrrole im Tierreich ist noch nicht in jedem Fall geklärt: außer einer Schutzfunktion (Tarnfarbe bei Vogeleiern, Schutz vor Photooxidation, z.B. bei Schmetterlingen, oder im Abwehrsekret von Aplysien (Rüdiger, 1967) wird bei Schmetterlingen auch eine Beteiligung der Pterobiline an der für die Larvalentwicklung wichtigen, inneren Uhr diskutiert (Bois-Choussy und Barbier, 1983).

Bei Pflanzen und Blaualgen kommen die Tetrapyrrole dagegen vor allem in der proteingebundenen Form als Biliproteine vor. Hier haben sie die wichtige Aufgabe entweder von Lichtsammelpigmenten (Phycobiliproteine der nichtgrünen Algen und Blaualgen) oder der Lichtperception (Phytochrom der höheren Pflanzen und Grünalgen, Mohr und Schopfer 1978; Phycochrom bei Cyanobakterien, Björn, 1980).

1.2. Vorkommen von proteingebundenen Gallenfarbstoffen bei Autotrophen

Sowohl die Antennenpigmente (Phycocyanin, Phycoerythrin und Allophycocyanin) in Cyanophyten, Rhodophyten und Cryptomonaden als auch das "Reaktionszentrum" des photomorphogenetischen Systems sind Biliproteide (Rüdiger, 1971). Darunter versteht man Proteinkomplexe von Gallenfarbstoffen mit kovalenter Protein-Chromophor-Bindung. Der Chromophor ist über eine Thioetherbindung (Ring A) an das Cystein des Apoproteins gebunden (Köst-Reyes et al. 1975; Köst-Reyes und Köst, 1979; Muckle et al. 1978; Köst et al., 1975, Schoch et al., 1976, Lagarias et al. 1979)

Für einige Biliproteide ist eine zusätzliche bzw. alternative Bindung der Biline über einen Thioether am Ring D (C 18) nachgewiesen (Klotz und Glazer, 1985; Nagy et al. 1985; Lundell et al. 1984, Schoenleber et al. 1984 a, b Bishop et al. 1986). Doppelt gebundene Chromophore finden sich vor allem auf der β -Untereinheit der Biliproteine.

1.2.1. Phytochrom

Während Phycocyanin (PC), Phycoerythrin (PE) und Allophycocyanin (APC) Massenpigmente darstellen, ist das Phytochrom als Reaktionszentrum der Photomorphogenese nur in Spuren vorhanden. Phytochrom existiert in zwei spektral unterschiedlichen, photoreversiblen Formen, P_r und P_{fr} (Absorption bei 660 nm, bzw. 730 nm) und dient als Mediator der Photomorphogenese (Übersicht bei Mohr, 1976 und Rüdiger, 1980). Die Photomorphogenese der grünen Pflanzen ist auf die Bildung von P_{fr} aus praesynthetisiertem P_r bei Belichtung der Pflanze zurückzuführen. Der über Cystein gebundene Bilinchromophor von P_r und P_{fr} ist strukturell mit dem Chromophor von PC (Abb. 2) bis auf den Substituenten an C_{18} identisch: während PC am C_{18} einen Ethylsubstituenten trägt, besitzen P_r und P_{fr} hier einen Vinylsubstituenten (Grombein et al. 1975; Klein et al. 1977, Rüdiger et al. 1980, Weller und Gossauer 1980). Die Photokonversion $P_r \rightarrow P_{fr}$ kommt durch Z-E-Isomerisierung an der Doppelbindung zwischen C_4 und C_5 zustande, wobei die Doppelbindung spektral unwirksam gemacht wird. (Kufer et al., 1982; Thümmeler und Rüdiger, 1983; Thümmeler et al. 1983; Thümmeler 1984) (für die Numerierung der Gallenfarbstoffe vgl. Abb. 1).

1.2.2. Phycobiliproteine: Phycocyanin, Allophycocyanin und Phycoerythrin

Rhodophytae, Cryptophytae und Cyanophytae enthalten bis zu 60% ihres Proteinanteils (Bogorad, 1975) rote (Phycoerythrine) und blaue (Phycocyanine und Allophycocyanine) Pigmente, die ihre charakteristische Färbung bedingen. Dabei enthalten manche Algen nur PC und APC (z.B. die Rotalge Cyanidium caldarium) während andere Algen zusätzlich PE enthalten (z.B. Porphyridium cruentum). Das Verhältnis der Biliproteine zueinander bzw. zu Chlorophyll ist oft komplementär abhängig von der Farbe des Lichtes, in dem die Algen wachsen (Bogorad, 1975). PE, PC und APC sind in vivo zu Phycobilisomen aggregiert. Bei den Phycobilisomen unterscheidet man 2 Typen: das Zwiebelschalenmodell des Porphyridium-Typen mit schalenförmig angeordneten Bilipro-

teinen (vgl. Gantt 1980 und Wanner und Köst 1980, Übersicht bei Cohen-Bazire und Bryant, 1982) und den einfacheren, scheibenförmigen Rhodella-Typ, der auch für viele Blaualgen typisch ist (Yamanaka et al., 1978). Die Phycobilisomen sind an der Außenseite der photosynthetischen Membranen lokalisiert (Gantt, 1969; Wehrmeyer, 1971). Neben PE, PC und APC enthalten die Phycobilisomen farblose Strukturproteine (Gantt et al. 1976; Yamanaka et al. 1978), sowie vermutlich eine Fußstruktur (Wanner und Köst, 1980.)

PE und PC sind die eigentlichen Lichtsammelpigmente, während APC die Anregungsenergie auf Chlorophyll, vorwiegend des Photosystem II überträgt (Scheer, 1981 und Referenzen). Eine Voraussetzung der guten Übertragung der Lichtenergie auf Chlorophyll nach dem Förstermechanismus (Grabowsky und Gantt, 1978), (Excitonen- bzw. Resonanztransfermechanismus ohne korrespondierenden Ladungs- oder Massetransport) ist die Fluoreszenz nativer Biliproteide. Der Energietransfer erfolgt von PE (Absorption 555 nm; Emission 585 nm) über PC (Absorption 620 nm; Emission 660 nm) zu APC (Absorption 650 nm; Emission 680 nm) (Grabowsky und Gantt, 1978, Köst et al. 1981) und schließlich zu Chlorophyll a_{II} des Reaktionszentrums (Scheer, 1981 und Referenzen hierin).

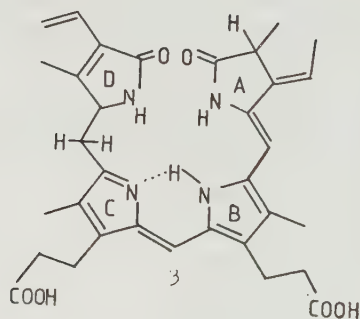
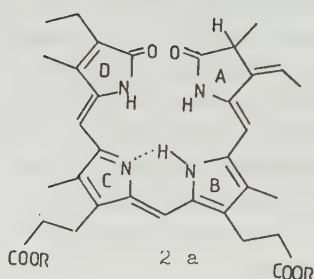
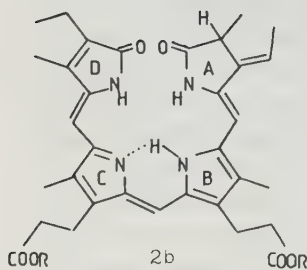
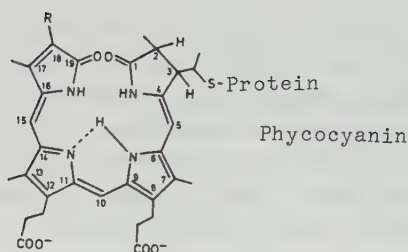
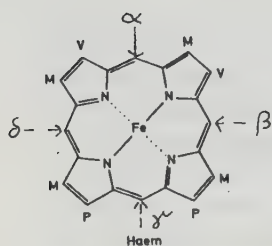
1.2.2.1. Der Chromophor der Phycobiliproteide

Der blaue Chromophor von PC und APC ist ein A-Dihydrobiliverdin, der an C18 mit einer Ethylgruppe substituiert ist. (Abb. 1). Bei dem roten Chromophor von Phycoerythrin ist die Doppelbindung an C15-C16 hydriert, das C18 trägt statt des Ethyl- einen Vinylsubstituenten (Abb. 1). Die kovalent gebundenen Bilinchromophore können z.B. mit siedendem Methanol (Fujita und Hattori 1964a und b; Cole et al. 1967, O'Carra und O'hEocha 1966, Chapman et al. 1967, Rüdiger et al. 1967, Crespi und Katz, 1969) oder höheren Alkoholen (Beuhler et al 1976) bzw. durch Erhitzen (Fu et al. 1979) abgespalten werden. Neben der Abspaltung mit dem Enzym Nagarse (Siegelmann et al. 1967) oder mit heißem

Wasser (Köst, 1974) kann die Thioetherbindung durch HBr (Schram und Kroes 1971; Rüdiger et al. 1980) oder HCl (O'Carra et al. 1964, O'hEocha 1963, Beuhler et al. 1976) gespalten werden. (Übersicht bei Scheer 1981 und Bennett und Siegelmann, 1979). Die Struktur der durch Elimination bei der Methanolyse gebildeten Biline, Phycocyanobilin (PCB) aus PC und APC bzw. Phycoerythrobilin (PEB) aus PE ist geklärt (Übersicht Scheer, 1981): Sie tragen am C3 des Ringes A einen Ethylidensubstituenten¹ (Abb. 1). Die Struktur des durch HCl abgespaltenen Bilins ist jedoch noch nicht endgültig geklärt: diskutiert wird eine Vinylsubstitution (O'Carra und O'hEocha, 1976; O'Carra et al. 1980), während auf der anderen Seite ein PCB - HCl-Addukt massenspektrometrisch nachgewiesen wurde (Beuhler et al, 1976). Neben der Konzentration der verwendeten Salzsäure spielt auch die Reaktionsdauer eine große Rolle für die Produktzusammensetzung; die entstehenden, unterschiedlich absorbierenden Biline scheinen zudem teilweise durch Inkubation mit HCl verschiedener Normalität ineinander umgewandelt zu werden (O'Carra und O'hEocha, 1976; O'Carra et al., 1980). Wie die an Ring D gebundenen Chromophore abgespalten werden ist noch unbekannt; es kann jedoch vermutet werden, daß die unterschiedliche "chemische Umgebung"² der beiden Thioether an Ring A bzw. Ring D (Abb. 1) auch eine unterschiedliche Reaktivität bedingt. Die meisten Biliproteine bestehen aus ungleichen, nicht kovalent gebundenen Untereinheiten, die unter denaturierenden Bedingungen voneinander getrennt werden können. Die Molekulargewichte der leichteren α -Untereinheit schwanken zwischen 10 - 20 kDalton, die der schwereren β -Untereinheit von 14-23 kDalton (Übersicht bei Bogorad, 1975). Bei den C-PC¹ trägt die α -Untereinheit einen, die β -Untereinheit zwei Chromophore (Glazer und Fang 1973),

¹ Sowohl die protein-gebundenen als auch die auf unterschiedliche Art und Weise abgespaltenen Biline werden in der Literatur mit den Trivialnamen Phycoerythrobilin bzw. Phycocyanobilin bezeichnet. In dieser Arbeit wurde für die abgespaltenen Biline mit Ethylidenfunktion an C3 die Bezeichnung PCB bzw. PEB verwendet; an der Ethylidenfunktion derivatisierte Gallenfarbstoffe wurden mit der Bezeichnung α -Substituent-PCB benannt; der proteingebundene Chromophor ist also ein α -Protein-PCB.

² für Phycocyanobilin ist dem Thioether eine β -ständige Carbonylgruppe, für Phycoerythrin-Chromophore sowohl eine β -ständige Carbonylfunktion als auch eine Doppelbindung im Ring D (α -ständig) maßgebend.



M = Methyl - CH_3 ; P = Propionsäure

R = C_2H_5

Abb. 1

Durch oxidative Ringspaltung des Haems in α Position ($\rightarrow$) entstehen offenkettige Biline der α -Reihe; Spaltung in β -, γ - oder δ -Position ($\dashrightarrow$) führt zu Tetrapyrrolen der β -, γ - bzw. δ -Reihe. Die zur α -Reihe gehörenden Chromophore der Biliproteine, z.B. des Phycocyanins (1) können durch Methanolyse abgespalten werden: dabei entsteht neben Spuren von Z-Methyl-Ethyliden-Phycocyanobilin (= Z-PCB, 2 a, als Dimethylester = dme) als Hauptprodukt E-Methyl-Ethyliden-PCB (2 b, als dme). Die Methanolyse des Phycoerythrins liefert als Hauptprodukt Phycoerythrobilin (= PEB, 3 als dme), ein Bilin, das sich von PCB durch den Vinylsubstituenten an C18 und die hydrierte Doppelbindung C15-C16 unterscheidet.

bei den C-PE¹ wurde außerdem das Verteilungsmuster α_2, β_4 und α_2, β_3 gefunden (Muckle und Rüdiger, 1977). Eine dritte, bilintragende Untereinheit - γ - wurde bei manchen Rotalgenphycoerythrin (B-PE¹) gefunden (Gantt und Lipschultz, 1974; Glazer und Hixon 1977). So ist B-PE¹ aus *Porphyridium cruentum* aus $(\alpha\beta)_6\gamma$ zusammengesetzt, wobei die α - und die β -Untereinheit je 2 PEB bzw. 3 PEB tragen, die γ -Untereinheit zusätzlich 2 Phycourobilin-Chromophore. (Glazer und Hixon 1977).

Immunologisch gesehen, erwiesen sich die Apoproteine innerhalb einer Klasse von Phycobiliproteiden, also PC, PE oder APC als nahe verwandt: so reagieren z.B. Antikörper gegen B-PE auch mit C-PE und manchmal Cryptomonad-PE und umgekehrt, nicht aber PC oder APC (Bogorad, 1975; Eder et al., 1978; Cohen-Bazire und Bryant, 1982). Antikörper gegen die α -Untereinheit von PE reagieren mit der β -Untereinheit und umgekehrt (Bogorad, 1975), Antikörper gegen die α -Untereinheit von APC zeigen eine Kreuzreaktion mit der β -Untereinheit (Cohen-Bazire und Bryant, 1982). Eine einfache Haptenwirkung scheint jedoch zumindest bei Biliproteiden im nativen Zustand ausgeschlossen (Cohen-Bazire und Bryant, 1982).

1.2.2.2. Biosynthese der Phycobiliproteide

Obwohl die chemische Natur von PCB und PEB schon seit längerer Zeit bekannt ist, sind noch nicht alle Schritte ihrer Biosynthese aufgeklärt.

Die Phycobiliproteide sind bei Eukaryoten auf dem Plastidengenom codiert und werden an 70S-Ribosomen translatiert, während farblose Polypeptide der Phycobilisomen im Cytosol translatiert und wohl durch die Kern-DNA codiert werden (Engelhoff und Grossmann, 1983). Es ist durch mehrere Arbeiten geklärt, daß zuerst das Apoprotein synthetisiert wird und dann die prosthetische Gruppe angeknüpft wird: so wird bei *Cyanidium caldarium* bei Hemmung der Porphyrinsynthese farblores "Apoprotein" angereichert

¹ Die Präfixe bezeichnen die natürliche Quelle der Phycobiliproteine: C aus Cyanobakterien, B aus den Bangiales, einer Rotalgenklasse, Cryptomonad aus Cryptophyceen

(Schuster et al 1983), das z.B. bei Zusatz von Haem zu Phycocyanin prozessiert wird (Schuster et al. 1983). Steinmüller et al. gelang die in-vitro-Synthese von farblosem Apoprotein 1983.

Startpunkt der Synthese der prosthetischen Gruppe ist die 5-Aminolaevulinsäure (ALA), die auf verschiedenen Stoffwechselwegen synthetisiert werden kann, bei grünen Pflanzen hauptsächlich über Glutaminsäure oder α -Ketoglutarat, in Bakterien, Heften und Säugetieren über die Verknüpfung von Glycin mit Succinyl-CoA; bei Blaualgen über einen oder beide der genannten Stoffwechselwege (Köst und Benedikt 1982 sowie Laycock und Wright 1980 und Zitate hierin). Durch Kondensation von zwei Molekülen ALA entsteht Porphobilinogen (Drabkin, 1976), das über Uroporphyrinogen, 7, 6, 5-Carboxy-Porphyrinogen, Coproporphyrinogen, 3-Carboxy-Porphyrinogen zu Protoporphyrin reagiert (Köst und Benedikt, 1982 und Zitate hierin). Hier verzweigt sich die Synthese durch Einbau von Eisen zu den Haeminen, durch Einbau von Magnesium zu den Chlorophyllen. Brown et al. (1981) und Schuster et al. (1983) konnten zeigen, daß Haem, nicht jedoch Mg-Porphyrin in PC eingebaut wird. Verläuft der Abbau von Haem bei Algen analog der oxidativen Spaltung bei Säugern, so muß durch oxidative Ringspaltung des Haems durch die bei Algen noch nicht endgültig nachgewiesene aber sehr wahrscheinliche Haemoxigenase (Brown und Holroyd 1984) zuerst Biliverdin entstehen. Bei Cyanidium caldarium wird Haemin analog dem Mechanismus bei Säugern nach dem 2-Molekularen Mechanismus (Troxler et al. 1979) gespalten. Nach der Spaltung zum Tetrapyrrol sind zur Synthese von PCB, das von Cyanidium caldarium neben anderen Vorläuferpigmenten (unter heterotrophen Bedingungen und Zusatz von ALA) ins Medium ausgeschieden wird (Troxler und Bogorad 1966; Troxler et al. 1978), noch zwei Reduktionsschritte möglich. Diese Reduktion läuft auf der Stufe des Tetrapyrrols ab: so wird Mesohaem z.B. nicht in PCB eingebaut (Brown und Holroyd 1984) und Biliverdin von Cyanidium caldarium ausgeschieden (Köst und Benedikt, 1981). Biliverdin

wird durch Zellextrakte von Cyanidium caldarium in einer NADPH-abhängigen Enzymreaktion zu Z- und E-PCB reduziert, wobei Z-PCB der Vorläufer von E-PCB zu sein scheint (Beale and Corneyo, 1984); Mesobiliverdin dagegen ist kein Vorläufer von PCB. Biliverdin enthält gegenüber PCB zwei Doppelbindungen mehr, eine Reihenfolge der Reduktionen wird wie folgt diskutiert:

Nimmt man an, daß zuerst die Vinylgruppe an Ring D reduziert wird, so könnte durch 1,4-Addition an das Halbmesobiliverdin direkt PCB entstehen. Andererseits besteht auch die Möglichkeit, daß durch Reduktion der endocyclischen Doppelbindung des Ringes A ein A-Dihydrohalbmesobiliverdin entsteht (Köst und Benedikt 1982). In diesem Fall wäre das in den Versuchen von Beale und Corneyo nachgewiesene Z- und E-PCBdme ein Umlagerungsprodukt des sehr reaktiven, nicht chiralen A-Dihydrohalbmesobiliverdin.

Der letzte Schritt der Proteinbiosynthese besteht nun in der Addition von H-S-Protein entweder an die Ethylidengruppe, die entweder Z- oder E-konfiguriert ist, oder an die Vinylfunktion. Etwas anders stellen sich die Verhältnisse bei einer zusätzlichen bzw. alternativen Bindung (Bishop et al., 1986) am Ring D dar. Hier kann weder Z- noch E-PCBdme den direkten Vorläufer darstellen, jedoch das D-Dihydrohalbmesobiliverdin bzw. A, D-Tetrahydrobiliverdin.

1.2.2.3. Abbau der Phycobiliproteide

Über den Abbau von PC bzw. PE ist noch sehr wenig bekannt: in mehreren Arbeiten wurde zwar der Abbau von PC bzw. PE beschrieben, so baut z.B. Porphyridium cruentum bei Sulfat- bzw. Nitratmangel die Biliproteine ab (Köst et al. 1984, Wanner und Köst 1984), in gleicher Weise reagiert Synechococcus 6301 (Thoma 1982, Henkelmann 1983; Wanner et al. 1986). Bei Anabaena cylindrica ist ein PC-spezifisches proteolytisches Enzym nachgewiesen, das bei der Heterocysten-Differenzierung aktiv ist (Foulds und Carr, 1977). Über den Verbleib der prosthetischen Gruppe, also ob diese ausgeschieden oder gespeichert wird, ist noch wenig bekannt.

2. Problemstellung

Die bei der Abspaltung des Bilin-Chromophors durch HCl von Phycocyanin entstehenden Tetrapyrrole (vgl. Einleitung) sollten UV-VIS- und massenspektroskopisch und anhand ihrer Abbauprodukte im Chromsäureabbau eindeutig charakterisiert werden. Zusätzlich war der Reaktionsmechanismus einzugrenzen. Im Hinblick auf die Isomerisierungsreaktionen (O'Carra und O'hEocha, 1976; O'Carra et al. 1980) der durch HCl abgespaltenen Biline sollte geprüft werden, ob sich der durch Methanolyse erhaltene Gallenfarbstoff (PCB) zu den Produkten der HCl-Abspaltung umlagern läßt; desgleichen sollte eine Umlagerung der durch HCl-Abspaltung erhaltenen Produkte zu PCB versucht werden.

Im Hinblick auf die Biosynthese von Gallenfarbstoff sollte geprüft werden, ob PCB in einem quasi-physiologischen System einfache Thiolverbindungen, wie Ethylmerkaptan bzw. Mercaptoethanol addiert. Die Produkte der Additionsreaktion sollten anhand spektroskopischer Daten und der durch Chromsäureabbau entstehenden Imide identifiziert werden.

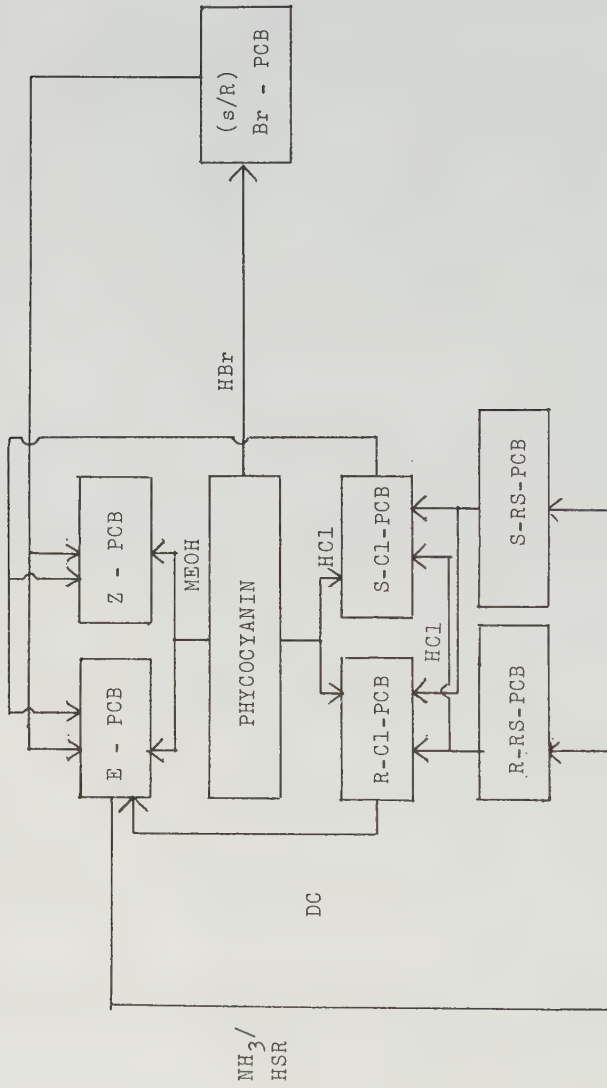
Es sollte außerdem anhand von PCB und PEB getestet werden, ob freie Gallenfarbstoffsäuren durch Isoelektrische Fokussierung gereinigt werden können, da für die Untersuchung des letzten Schritts der Biliprotein-Biosynthese (Verknüpfung Bilin-Apoprotein) unveresterte Gallenfarbstoffe, z.B. für Fütterungsexperimente wünschenswert sind.

In Weiterführung der in der Diplomarbeit durchgeführten Untersuchungen zur immunogenen Wirkung des Phycoerythrins sollten Versuche zur Haptenwirkung des Bilin-Chromophors durchgeführt werden. Dazu waren kurzkettige Chromopeptide an geeignete Träger zu koppeln.

Des weiteren sollte untersucht werden, ob während des durch Schwefelmangelbedingungen bei *Synechococcus* 6301 induzierten PC-Abbaus im Nährmedium pyrrolische Substanzen auftreten.

3. Zusammenfassung der Ergebnisse

1. Es konnte eindeutig gezeigt werden, daß die primären Hauptprodukte der Bilinabspaltung mit Salzsäure am C3' mit Chlor substituierte A-Dihydromesobiliverdine darstellen. Die im Verhältnis ca. 1 : 2-3 gleich S-konfiguriert : R-konfiguriert entstehenden α -Chlor-PCBdme wurden anhand ihrer UV-Vis-Daten, mit Hilfe der FAB-Massenspektroskopie sowie durch Chromsäureabbau und spezifischer Reaktionen der entstehenden Imide identifiziert.
2. Es wurde nachgewiesen, daß S-konfiguriertes α -Chlor-PCBdme während der DC auf Kieselgel G zu gleichen Teilen zu Z- und E-PCBdme eliminiert, während R-konfiguriertes α -Chlor-PCBdme unter diesen Bedingungen zu E-PCBdme eliminiert.
3. Es konnte gezeigt werden, daß HCl an PCBdme addiert. Die annähernd quantitativ aus PCBdme entstehenden α -Chlor-PCBdme sind am C3' mit Chlor substituiert; das Verhältnis der diastereomeren α -Chlor-PCBdme zueinander ist das gleiche wie bei der Abspaltung des Chromophors vom Phycocyanobilin.
4. Es konnte gezeigt werden, daß die Abspaltung des Bilins von Phycocyanin schon bei -19°C abläuft. Die Bilinabspaltung kann auch mit gasförmiger HCl in TFA durchgeführt werden, wobei die Produkte denen der Abspaltung mit Salzsäure entsprechen.
5. Ein bei der Abspaltung mit Salzsäure in sehr kleinen Mengen entstehendes Bilin konnte durch Erwärmen von HCl-PCB-Rohextrakt gewonnen werden. Für dieses grüne Bilin konnte anhand der UV-Vis-Daten, der Ergebnisse des Massenspektrums eine Substitution am C3' bei dehydriertem Ring A wahrscheinlich gemacht werden.
6. Anhand der Spaltung von einfach gebauten Phycocyanobilin-Thioethern (Ethylthio.PCB) mit Salzsäure konnte gezeigt werden, daß die Labilität der Thioetherbindung Bilin-Protein nicht auf Nachbargruppeneffekten des Proteins beruht.
7. Ein dem α -Chlor-PCBdme analoges α -Brom-PCBdme konnte bei der Bilinabspaltung mit HBr in TFA nachgewiesen werden.



Schema 1: Säure- und basekatalysierte Additionsreaktionen an Ethylen-PCBdme und ihre Abspaltungsreaktionen.

8. Die ammoniak-katalysierte Eliminierung von α -Chlor-Succinimiden zu den Ethylidensuccinimiden konnte in analytischem Maßstab auf HPTLC-Platten durchgeführt werden.
9. Es konnte gezeigt werden, daß Ethylmerkaptan in Methanol unter Basenkatalyse regioselektiv an das C3' von PCBdme addiert, wobei die all-R-konfigurierte Form im Diastereomerengemisch überwiegt. Als Additionsprodukt von PCBdme und Merkapt ethanol konnte unter gleichen Bedingungen ein C3'-Hydroxyethylthio-PCBdme nachgewiesen werden.
10. Es wurde nachgewiesen, daß die Addition von Merkapt ethanol auch in wässriger Lösung bereits bei einem pH von ca. 10 zu den C3'-Hydroxyethylthio-PCBdme führt. Damit erhöht, sich die Wahrscheinlichkeit, daß das von den Algen ausgeschiedene PCB der direkte Vorläufer des proteingebundenen Chromophors ist.
Die Umlagerungen der einzelnen Bilindme sind in Schema 1 zusammengefaßt
11. Es konnte gezeigt werden, daß unveresterte Gallenfarbstoffe durch Isoelektrische Fokussierung gereinigt werden können.
12. Anhand der durch Isoelektrische Fokussierung bestimmten Isoelektrischen Punkte und der durch spektrophotometrische Titration ermittelten pKa-Werte des Stickstoffes konnte der pKa-Wert der Carboxylgruppen zu durchschnittlich 4,4 berechnet werden.
13. Eine Haptenwirkung des Bilinchromophors im System Sephadex-Phycoerythrinchromopeptide bzw. Haemocyanin-Phycoerythrinchromopeptide konnte ausgeschlossen werden.
14. Im Medium von Synechococcus 6301 konnten unter Schwefelmangelbedingungen pyrrolische Substanzen nachgewiesen werden, die sich chromatographisch wie Gallenfarbstoffe verhalten und durch Chromsäure zu Imiden abgebaut werden.
15. Durch Inkubationsversuche von Phaeophorbid bzw. Phycocyanobilin konnte wahrscheinlich gemacht werden, daß die oben genannten pyrrolischen Substanzen nicht-enzymatisch durch Photooxidation aus Phycocyanobilin gebildet werden.

II. Ergebnisse und Diskussion

1. Struktur und Eigenschaften des mit HCl aus Phycocyanin abgespaltenen Bilins (= HCl-Chromophor)

1.1. Darstellung des HCl-Chromophors bzw. des Ethyliden-Phycocyanobilins

Der Chromophor von Biliproteinen, wie Phycocyanobilin oder Phycoerythrobilin kann, vgl. I. 1.2.2.1., durch Kochen mit Methanol (Fuji-ta, Y. und Hattori, A., 1962; Ó Carra, P. und Ó HEocha, C., 1966) oder durch Einwirkung von Mineralsäuren wie HCl (Ó HEocha, C., 1963) oder HBr (Schram, B.L. und Kroes, H.H., 1971) abgespalten werden¹. Bei der Methanolyse des Thioethers entsteht neben violinoiden, rotgefärbten Bilinen als Hauptprodukt ein blau gefärbter Gallenfarbstoff, dessen Struktur und Konfiguration unter anderem auch totalsynthetisch als E-Methyl-Ethyliden-Phycocyanobilin nachgewiesen wurde (Gossauer, A. und Hirsch, W., 1974)¹. (Abb. 1). Bedingt durch die, im Vergleich mit dem proteingebundenen Chromophor, zusätzliche Doppelbindung (E.Köst-Reyes, 1978, Köst, H.-P., 1974; Köst, H.-P. et al., 1974) absorbieren die Ethyliden-PCBdme (E- bzw. Z-konfiguriert) bzw. die freien Säuren bei um etwa 20 - 30 nm höheren Wellenlängen als der gebundene Chromophor in denaturierenden Lösungsmitteln (Crespi et al. 1968, Ó'Carra, Ó'hEocha, 1966 Scheer, 1981). Bei Abspaltung mit HCl resultiert ein Bilin, dessen Absorption im Vergleich mit E-PCBdme hypsochrom verschoben² ist und im Bereich des proteingebundenen Phycocyanobilins in denaturierenden Lösungsmitteln liegt: proteingebundenes PCB absorbiert bei 660 nm, HCl-abgespaltenes Phycocyanobilin bei 650 nm - 660 nm (Ó Carra, P. und Ó HEocha, C., 1966).

1.1.1. Darstellung und Reinigung von Methyl-Ethyliden-PCBdme (E-konfiguriert)

Sprühgetrocknete Algen, Spirulina maxima, wurden zur Entfernung

¹ ob und in welchem Ausmaß als Nebenprodukt Z-PCBdme entsteht ist abhängig von Reaktionsdauer und Temperatur, vgl. Beale und Cornejo 1984

² besonders groß ist die hypsochrone Verschiebung in saurer Methanol (-40 nm); jedoch tritt sie in allen verwendeten Lösungsmitteln auf

von Chlorophyll und Carotenoiden mehrmals mit heißem Methanol abgenutzt und der Algenrückstand 4 h unter Rückfluß mit Methanol gekocht (nach O Carra, P. und O HEocha, C., 1966, verändert). Die abgespaltenen Biline wurden in Chloroform extrahiert und mit 6% H_2SO_4 /Methanol verestert. E-PCBdme wurde durch mehrmalige Dünnschichtchromatographie (DC) an Kieselgel G (nach Stahl, E. 1967) aufgereinigt und seine Identität sowohl spektrophotometrisch als auch durch Chromsäureabbau (Rüdiger, W., 1969) überprüft. Die Absorption von E-PCBdme liegt in Übereinstimmung mit den Literaturdaten in neutralem Chloroform bei 600 nm und in saurem Methanol bei 690 nm (Cole, W.J. et al. 1967; Brown, S.B. et al., 1980; vgl. Abb. 3); der Chromsäureabbau lieferte neben Methyl-Ethyl-Maleinimid (= MEM), Hämatinsäureimid-Methylester (= HSE), freiem Hämatinsäureimid (= HS, durch saure Esterhydrolyse entstanden) E-konfiguriertes Methyl-Ethyliden-Succinimid (= E-MDES) (vgl. 1.3.) mit relativen Ausbeuten von ca. 1 : 1,5 : 0,3 (= MEM:HSE : E-MDES).

1.1.2. Darstellung, Reinigung und Eigenschaften von HCl-PCBdme

Durch Aufschluß der sprühgetrockneten Blaualge *Spirulina maxima* und fraktionierte Ammoniumsulfatfällung bzw. Chromatographie an DEAE-Zellulose gewonnenes Phycocyanin (nach Kufer, W., 1980) wurde mit HCl konz. im Dunklen incubiert. Vorversuche hatten gezeigt, daß eine Reaktionsdauer von 1 Stunde bei ca. 20° C die beste Ausbeute an HCl-PCB ($\lambda = 648 \text{ nm/s.MeOH}$) erbrachte (vgl. Tabellen im Exper. Teil). Die Reaktionsmischung weist ein scharfes Maximum bei 384 nm und einen relativ breiten Peak bei 670 nm auf. Um die Extraktion¹ der Biline zu verbessern, wurde die Salzsäurelösung vor allem bei kleineren Proben mit einem Volumenteil Methanol versetzt, und anschließend quantitativ in Chloroform extra-

¹ Bei sehr kleinen Ansätzen (max. 2 ml Salzsäure) kann die HCl auch durch Gefriertrocknung im Hochvakuum entfernt werden. Diese Methode ist nur dann von Vorteil, wenn die HCl innerhalb von 1 h abgezogen werden kann, da sonst violinoide Produkte (E in saurem Methanol bei 612 nm) sehr stark überhand nehmen.

hiert. Die Chloroformphase wurde mit dest. Wasser neutral gewaschen, am Rotationsverdampfer zur Trockene gebracht und der Rückstand mit 6 % $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{MeOH}$ verestert (16 h, -19°C). Die veresterten Gallenfarbstoffe (= dme) extrahierte man in Chloroform und arbeitete wie oben auf. Der veresterte Pigmentrohextrakt (Rohextrakt_{dme}) absorbiert in saurem Methanol (1.5 ml MeOH, 100 μl 6% H_2SO_4) bei 352 nm/652 nm mit einer Schulter bei 612 nm.

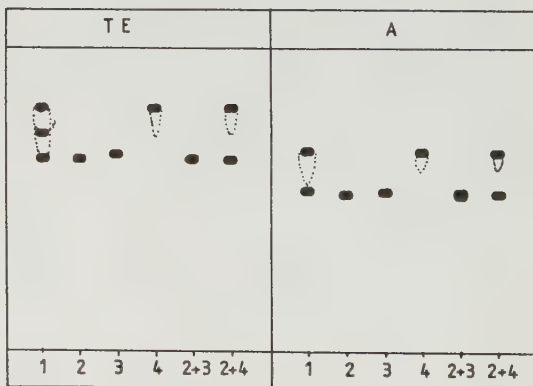
1.1.2.1. Chromatographische Eigenschaften von HCl-PCBdme

Bei der DC des HCl-Rohextrakt_{dme} auf Kieselgel G ließ sich sowohl im System TE als auch im System A ein im Vergleich zu E-PCBdme höher wandernder, blau-violetter Gallenfarbstoffdme abtrennen. Dieser Bilindme ($\text{hRF}/\text{TE} = 30$, $\text{hRF}/\text{A} = 66$) entsteht nur bei der Abspaltung mit HCl, nicht jedoch bei der Methanolyse von Phycocyanin (Abb. 2) und wird im folgenden als HCl-PCBdme bezeichnet. Neben HCl-PCBdme fand sich ein in beiden Systemen mit E-PCBdme co-chromatographierender Bilindme ($\text{hRF}/\text{TE} = 64$, $\text{hRF}/\text{A} = 54$), der als Methanol-Co bezeichnet wird. Im System TE ließ sich zusätzlich ein

Abb.: 2

Analytische DC eines HCl-Rohextraktes
Fließmittelsystem: TE und A

- 1 HCl-Rohextrakt_{dme} (nicht gezeichnet sind die violinoiden Produkte mit hRF -Werten unter 50)
 - 2 E-PCBdme (hRF/Te 64; hRF/A 54)
 - 3 Methanol-Co (hRF/TE 64; hRF/A 54)
 - 4 HCl-PCBdme (hRF/TE 80, hRF/A 66)
- gepunktelter Umriss: "Schmierzone"



blauer Chromophor mit hRF 72 abtrennen. HCl-PCBdme wanderte nicht in einer scharfen Bande, sondern schmierte relativ stark. Bei der Rechromatographie dieser "Schmierzone" traten jedoch wieder 3 scharfe Banden auf (hRF in TE 64, 72 bzw. 80; vgl. Pkt. 1.9.). Auffällig war, daß Methanol-Co im Einzelchromatogramm etwas höher lief als E-PCBdme, sich jedoch im Mischchromatogramm im System TE nicht, im Fließmittel A nicht klar abtrennte. Der Bilindme mit hRF 72 (TE) trat nur dann auf, wenn das System TE verwendet wurde, d.h. chromatographierte man nur im System A war dieser Chromophor nicht nachzuweisen. Wenn aber zuerst im System TE entwickelt wurde, trennte sich dieses Bilin auch im System A ab.

Diese Befunde lassen auf Umlagerungen der Bilindme während der DC schließen, da zudem das Verhältnis Methanol-Co : HCl-PCBdme nach der Chromatographie 5 : 1 betrug, bei den vor der DC aufgenommenen Spektren jedoch kein Peak bei 690 nm (Absorption von E-PCBdme in saurem MeOH) auftrat.

1.1.2.2. Spektrophotometrische Daten von HCl-PCBdme und Modelle

Das nur bei der Abspaltung mit HCl auftretende HCl-PCBdme weist in saurem Methanol ein Maximum von 648 nm auf, die nahe UV-Bande liegt bei 340 nm. Bei gleicher Absorption im UV-Bereich absorbiert der Bilindme in neutralem Chloroform bei 585 nm, in neutralem Methanol bei 592 nm. E-PCBdme absorbiert bei 380 nm/690 nm in saurem Methanol, 369 nm/625 nm in neutralem Methanol und 365 nm/600 nm in neutralem Chloroform (Abb. 3). Die spektroskopischen Daten lassen sich durch mehrere Modelle erklären (Abb. 4): Die in Methanol besonders ausgeprägte hypsochrome Verschiebung liegt im Bereich des Inkrements für eine C-C-Doppelbindung (Williams, D.H. und Fleming, I., 1985) und läßt sich entweder durch eine Addition an die exocyclische Doppelbindung an Ring A oder einer Unterbrechung der Konjugation zum übrigen π -System erklären. Eine Unterbrechung der Konjugation könnte entweder durch Isomerisierung der Doppelbindung Ethyliden-Vinyl (vgl.

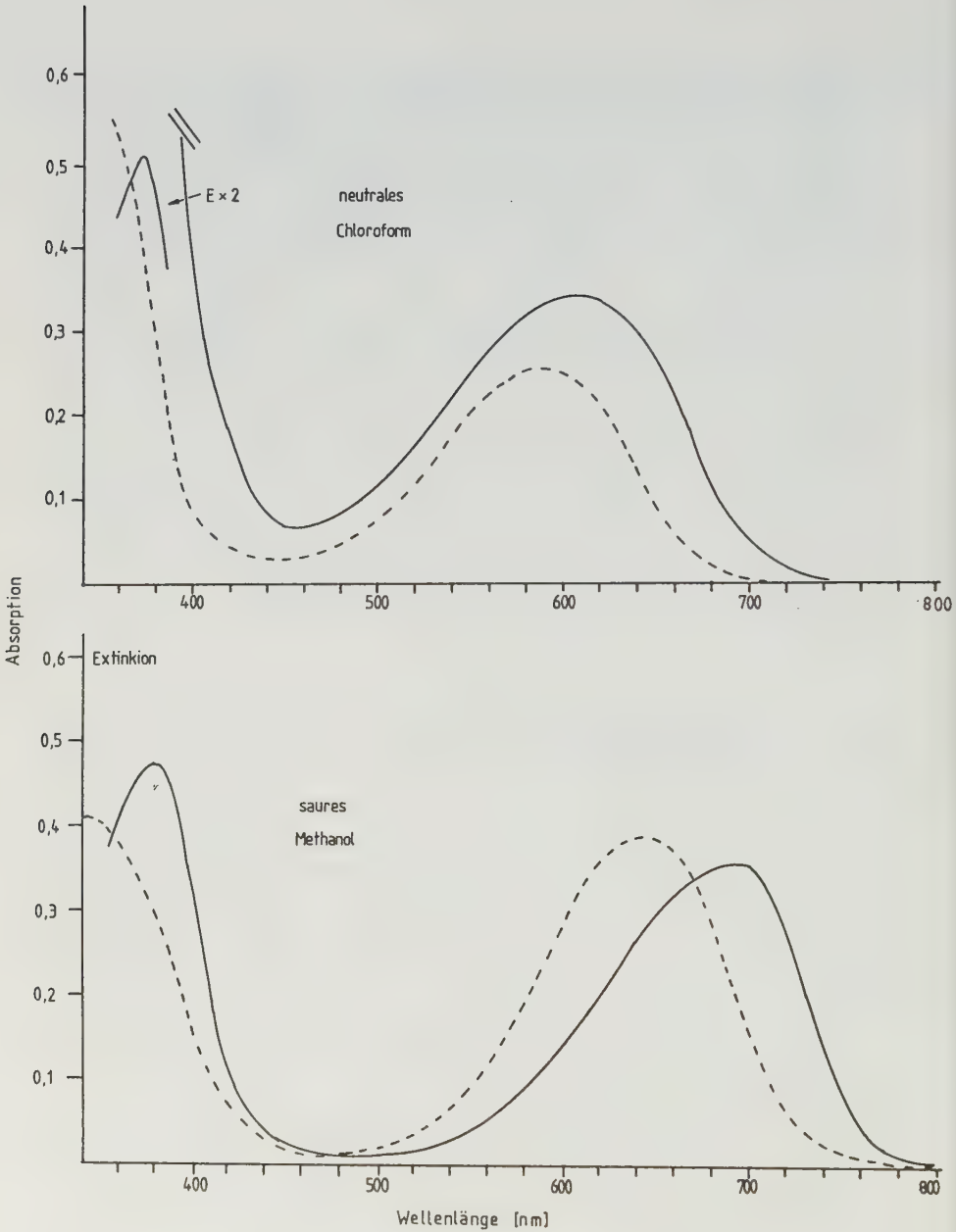


Abb.: 3

Während E-PCBdme (.....) in neutralem Chloroform bei 600nm /365 nm, in Methanol/ H_2SO_4 bei 690 nm /378 nm absorbiert, liegen die Maxima von HCL-PCBdme (hRF 80 in Fließmittel TE; —) bei 585 nm /340 nm in neutralem Chloroform bzw. bei 645 nm/340 nm in Methanol/ H_2SO_4 .

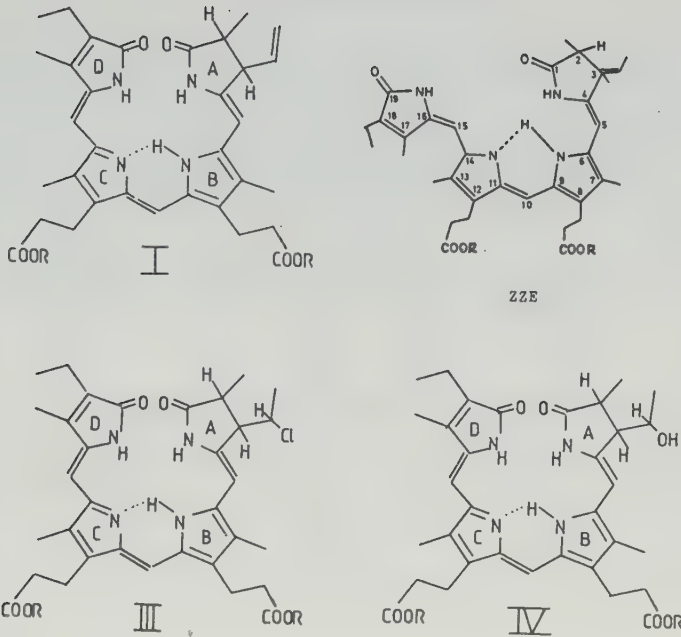


Abb. 4

Die bathochrome Verschiebung der Maxima des HCl-PCBdme läßt sich mit mehreren Modellen erklären: bei gleichbleibender Zahl der Doppelbindungen kann die Konjugation durch Isomerisierung Ethylden-Vinyl (I) oder durch Z-E-Isomerisierung der Substituenten an C4, C5 resp. (II) verkürzt werden. Durch formale Addition von HCl (III) bzw. H_2O (IV) an C3-C3' verringert sich die Zahl der Doppelbindungen insgesamt.

Ó Carra, P. 1976) (I in Abb. 4) oder durch Herausdrehen aus der Konjugationsebene (II in Abb. 4)¹. So resultiert z.B. aus der Konfigurationsänderung an der Methinbrücke zwischen Ring C und D bei Modellbilinen (z.B. Etiobiliverdin, Falk, H. und Grubmayr, K., 1977) bzw. Phycocyanin- oder Phytochrombilibepptiden ZZZ→ZZE zu einer hypsochromen Verschiebung von ca. 65 nm (PC-Chromopeptide) (Thümmeler, F. 1984). Auf der anderen Seite kann durch (formale) Addition von H_2O oder HCl an die Ethyldendoppelbindung ein α -Chlor substituiertes PCBdme (vgl. Beuhler, R. et al., 1976) (III) bzw. ein α -Hydroxy-PCBdme gebildet werden (Rüdiger, W. (IV in Abb. 4), dessen Absorption durch das Fehlen der Doppel-

¹ gezeichnet ist das EZZ-Isomere (nach Thümmeler, F. verändert)

bindung ebenfalls hypsochrom verschoben sein sollte. Aufgrund des hohen hRF-Wertes (in TE 80, in A66) erschien ein polares α -Hydroxy-PCBdme unwahrscheinlich; Beweise für oder gegen die anderen Strukturen ließen sich aus den hRF-Werten bzw. spektroskopischen Daten nicht ableiten, jedoch erschien die hypsochrome Verschiebung von 42 nm für eine ZZZ $\rightarrow$ EZZ-Isomerisierung etwas gering. Eine eindeutige Unterscheidung sollte jedoch durch einen Chromsäureabbau möglich sein (Rüdiger, W. 1969).

1.2. Chromsäure- und Chromatabbau von HCl-PCBdme

Chromsäure- und Chromatabbau sind bewährte Mittel zur Analyse von Gallenfarbstoffen (Rüdiger, W. 1969). Beim Chromsäureabbau wird das Tetrapyrrol in Imide gespalten (Abb. 5), wobei die exocyclischen Substituenten unverändert erhalten bleiben. Bei kleinen Mengen an Ausgangsmaterial kann diese Reaktion "in situ" auf der Platte durchgeführt werden (Rüdiger, W. 1969). Die Imide können durch analytische DC getrennt und nach Anfärbung mit Chlor-Benzidin identifiziert¹ werden. Während der Chromsäureabbau keine Aussagen über die Anordnung der Pyrrolkerne erlaubt, kann diese Information über den sogenannten Chromatabbau (Rüdiger, W. 1969) erhalten werden. Hier werden nur die äußeren Pyrrolkerne als Imide abgespalten, die inneren Kerne jedoch als Pyrroldialdehyde freigesetzt. Abb. 5. zeigt die Imide bzw. Pyrroldialdehyde, die beim Chromsäure- bzw. Chromatabbau von E-PCBdme freigesetzt werden: Methyl-Ethyl-Maleinimid (MEM), HSE (Hämaminsäureimid-Methylester), HS (freies Hämaminsäureimid) und E-Methyl-Ethyliden-Succinimid (E-MAES) bzw. 3-Methyl-4-(2-methoxycarbonyl-ethyl)-Pyrroldialdehyd (MPD), der aus den inneren Ringen (B, C) beim mildereren Chromatabbau freigesetzt wird.

Während EZZ-PCBdme (Abb. 4) nach dem Chromsäure-, bzw. Chromatabbau dieselben Imide liefern muß wie E-PCBdme (ZZZ), wird bei den anderen Modellen entweder ein Methyl-Vinyl-Succinimid (MVS), ein Methyl-(2-Hydroxy-ethyl)-Succinimid (= α -Hydroxysuccinimid) oder ein Methyl-(2-Chlor-ethyl)-Succinimid (MClS)

¹ aufgrund der Cancerogenität von Benzidin wurde hier Tetramethylbenzidin verwendet

E-Methyl-Ethyliden-PCBdme

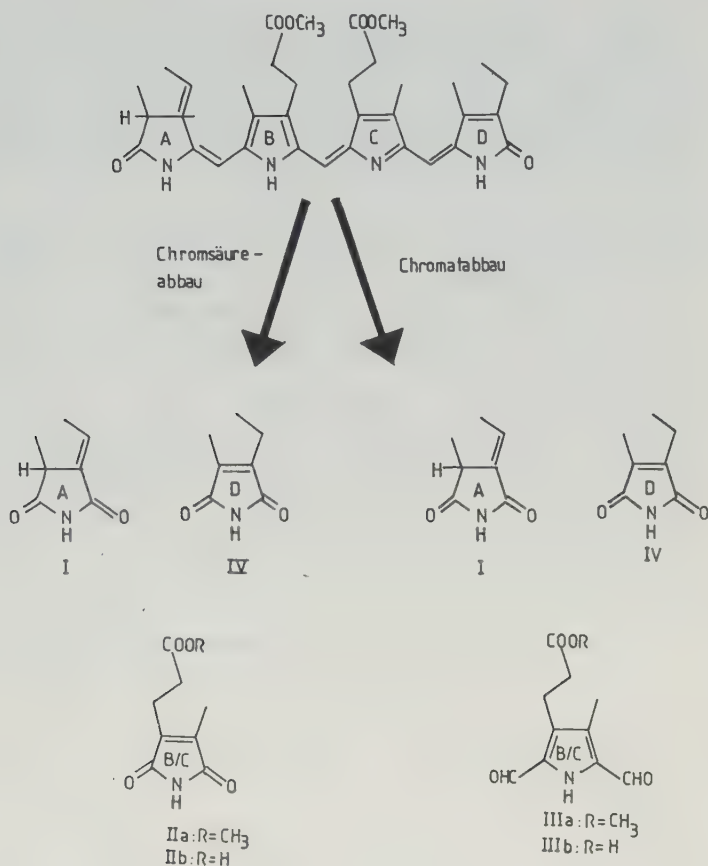


Abb. 5

Durch Chromsäureabbau von E-PCBdme erhält man E-Methyl-Ethyliden-Succinimid (I; aus Ring A), Haematinic säuremethylester-Imid bzw. das durch saure Hydrolyse gebildete Haematinic säureimide (IIa, b; aus Ring B, C) sowie Methyl-Ethyl-Maleinimid (IV; aus Ring D). Der mildere Chromatabbau spaltet die äußeren Ringe A, D ebenfalls als Imide (I und IV) ab, während die inneren Ringe B, C als Pyrroldialdehyde (IIIa, b) frei werden.

erwartet. Sowohl MCIS als auch α -Hydroxy-Succinimid sind in der Literatur beschrieben (Klein, G. 1977, Schoch, S. et al. 1974,76), die entsprechenden Imide sollten daher durch ihr chromatographisches Verhalten bzw. spezifische Reaktionen eindeutig identifiziert werden können.

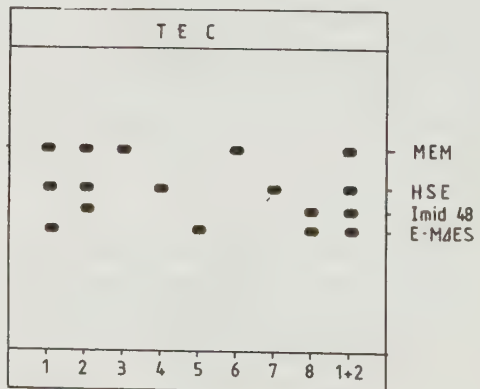
1.2.1. Ergebnisse des Chromsäureabbaus von HCl-PCBdme

Sowohl nach analytischem Abbau von HCl-PCBdme auf der Platte, als auch nach "präparativem" Chromsäureabbau (vgl. Exp. Teil) lassen sich dünnsschichtchromatographisch 3 Imide mit folgenden hRF-Werten nachweisen: hRF in TEC 70, 53 und 48, während aus E-PCBdme MEM, hRF 70, HSE hRF 53 und E-M~~A~~ES, hRF 41 entstehen (Abb. 6). Die Imide mit hRF 70 bzw. 53 konnten durch Cochromatographie mit MEM¹ bzw. HSE eindeutig als diese identifiziert werden, das Imid mit hRF 48 trennt sich hierbei von E-M~~A~~ES ab. Bemerkenswert ist außerdem die Ausbeute an dem aus Ring A stammenden Imid (vgl. 1.2.2.) mit hRF 48: während E-M~~A~~ES, verglichen mit HSE und MEM in deutlich geringerer Ausbeute entsteht, die

Abb. 6 Chromsäureabbau von
PCBdme und HCl-PCBdme

- 1 E-PCBdme
- 2 HCl-PCBdme
- 3 MEM
- 4 HSE
- 5 E-M ES
- 6 oberstes Imid aus 2 + MEM
- 7 mittleres Imid aus 2 + HSE
- 8 unterstes Imid aus 2 + E-M ES

Fließmittel TEC



¹ MEM chromatographiert meist mit Methyl-Vinyl-Maleinimid (MVM), fluoresziert aber im Gegensatz zu diesem nicht.

Intensität der Flecke verhält sich wie 0.3 : 1,5 : 1 (Troxler, et al.1978), entsteht das Imid hRF 48 (=Imid hRF 48) in dem MEM vergleichbaren Ausbeute. Dies deutet auf eine größere Stabilität des Imides verglichen mit M4ES hin und läßt eine instabile Vinylstruktur (Abb. 4) unwahrscheinlich werden. Auszuschließen war durch das gefundene Imidmuster auf jeden Fall das Modell 2 (Abb. 4) mit unterschiedlicher Konfiguration an der Methinbrücke 4-5.

1.2.2. Ergebnisse des Chromatabbaus: Nachweis der Ringanordnung ABCD

Wie erwähnt, werden beim Chromatabbau nur die äußeren Ringe als Imide, die inneren Ringe dagegen als Pyrroldialdehyde abgespalten (Rüdiger, W. 1969). Letztere können durch Besprühen mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin als braune Flecke nachgewiesen werden (Rüdiger, W., 1969). Der HCl-Chromophor wurde im Vergleich

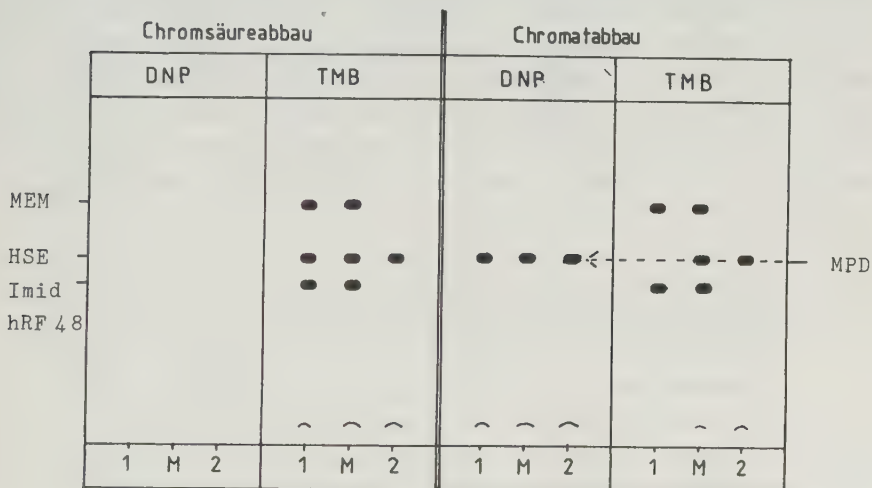


Abb. 7: Chromsäure und Chromatabbau von HCl-PCBdme und Coprobiliverdin-tetramethylester

Fließmittel TEC

1 = HCl-PCBdme 2 = Coprobiliverdintetramethylester

M = 1 + 2; DNB = Visualisierung mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin; TMB = Visualisierung mit Chlor/Tetramethylbenzidin

mit Coprobiliverdin-Tetramethylester¹, der ausschließlich HSE (Chromsäureabbau) bzw. MPD² (Chromatabbau) liefert, mit Chromat abgebaut. Im Vergleich mit dem parallel durchgeführten Chromsäureabbau zeigt sich, daß das Imid mit hRF 48 sowohl durch Chromsäure- als auch Chromatabbau freigesetzt wird (Abb. 7; Visualisierung mit TMB). Der Chromatabbau liefert ein mit 2,4-Dinitrophenyl-Hydrazin reagierendes Produkt, das mit MPD identisch ist. Das Auftreten von MPD beim Chromatabbau des HCl-PCBdme beweist, daß das Imid hRF 48 aus einem endständigen Ring entstammt und das Pigment der IX α Reihe zuzuordnen ist.

1.3. Strukturaufklärung des Imides hRF 48 aus HCl-PCBdme

1.3.1. Ausschluß einer Doppelbindung in dem Imid hRF 48

Während die Reaktivität der Imide gegenüber TMB gleich ist, unterscheiden sich Maleinimide und Succinimide hinsichtlich ihrer Reaktivität gegenüber Kaliumpermanganat. Maleinimide werden sofort als gelbe Flecken auf einem rosa gefärbten Untergrund sichtbar, während Succinimide mit einer exocyclischen Doppelbindung erst nach Stunden reagieren (Köst, H.-P., 1974). Ein Succinimid mit einer reaktiven exocyclischen Doppelbindung, wie sie bei einem Methyl-Vinyl-Succinimid vorliegen sollte, sollte jedoch schnell mit Kaliumpermanganat reagieren. Da das Imid hRF 48 jedoch im Gegensatz zu dem aus HCl-PCBdme entstandenen MEM und HSE überhaupt nicht mit Kaliumpermanganat reagiert, ist auch eine Vinylstruktur des Chromophors (1 in Abb. 4) auszuschließen.

1.3.2. Identifizierung des Imides hRF 48 als 3-Methyl-2-(2-Chlor-ethyl)-Succinimid (MCLS)

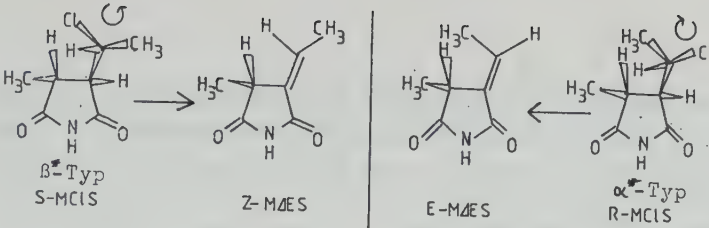
1.3.1.1. Synthese der diastereomeren 3-Methyl-2-(2-Chlor-ethyl)-Succinimide

Ausgehend von α -Hydroxy-Succinimid wurde durch nukleophile Substitution mit Thionylchlorid die Hydroxygruppe gegen Chlor ausgetauscht (Klein, G., 1977; Schoch, S. et al. 1974). Dabei ent-

¹ für die Überlassung von Coprobiliverdintetramethylester danke ich Frau E. Benedikt ganz herzlich

²

MPD = 3-Methyl-4-(2-methoxycarbonyl-ethyl)-pyrrol-dialdehyd



Fließmittel			hRF-Werte						
Benzol	Dioxan	Eisessig	MEM	HSE	β -MClS	α -MClS	Z-MAES	E-MAES	Imid 48
100	8	0.3 (BDE)	57	60	55	51	51	45	51
Tetrachlorkohlenstoff Essigsäureethylester Cyclohexan = 6 : 3 : 1 (TEC)			70	53	48	41	47	41	48

Tabelle 1: hRF-Werte der gereinigten Imide auf Kieselgel G-Platten (Merck, für die Nano-DC)
Die Imide wurden durch Einstellen der Platten in Aceton focussiert; hRF-Werte sind auf den Auftragspunkt bezogen.

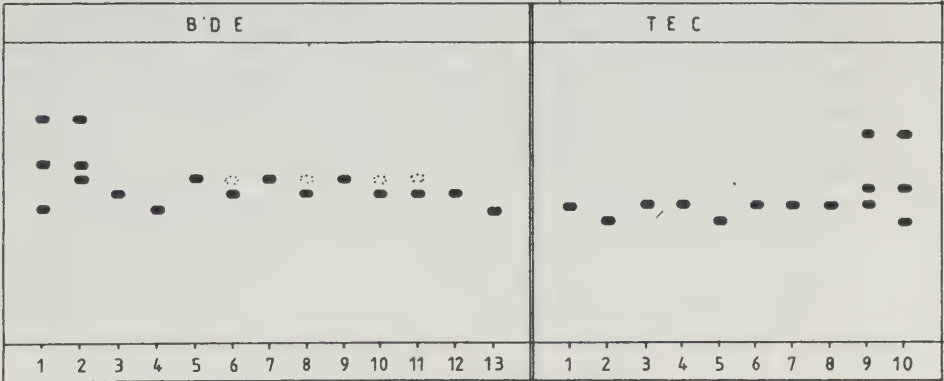


Abb. 8 Chromatographie des Imides 48 mit -MClS, -MClS sowie der Eliminierungsprodukte in den Systemen BDE und TEC

BDE			TEC		
1 = Chromsäureabbau von E-PCBdme	8 = Imid 48 + NH ₃ (1.3 N/l; 1h)		1 = Z-MAES	7 = Imid 48 + NH ₃	
2 = Chromsäureabbau von HCl-PCBdme	9 = Imid 48 + S-MClS		2 = E-MAES	8 = Imid 48 + Z-MAES	
3 = β -MClS	10 = Imid 48 + NH ₃ + Z-MAES		3 = Imid 48	9 = Chromsäureabbau: HCl-PCBdme	
4 = β -MClS + NH ₃ (1.3 M/l; 1h)	11 = Imid 48 + NH ₃ + β -MClS + NH ₃		4 = β -MClS	10 = Chromsäureabbau: E-PCBdme	
5 = α -MClS			5 = α -MClS		
6 = α -MClS + NH ₃ (1.3 M/l; 1h)	12 = Z-MAES		6 = Imid 48 + β -MClS		
7 = Imid 48	13 = E-MAES				

E-MAES ist das Eliminationsprodukt von α -MClS, Z-MAES das von β -MClS; siehe Formelschema. Imid 43 aus HCl-PCBdme ist identisch mit β -MClS.

stehen chlorierte Succinimide mit unterschiedlicher Konfiguration an C2', die sich aufgrund ihrer RF-Werte sowohl vom Edukt als auch voneinander trennen lassen (Klein, G., 1977). Dem höher wandernden synthetischem Imid wurde von Klein und Rüdiger 1978 eine RSS bzw. SRR¹-Konfiguration (= β^* -Typ) zugeordnet, dem tiefer wandernden eine RRR- bzw. SSS-Konfiguration (α^* -Typ; vgl. Abb. 8, gezeichnet ist jeweils nur ein Antipode (RRS bzw. RRR)).

1.3.2.2. Chromatographische Eigenschaften der diastereomeren Chlorsuccinimide im Vergleich mit dem Imid hRF 48

Die diastereomeren MC1S trennen sich in den verwendeten Fließmitteln CEC, TEC und BDE auf Kieselgel G gut voneinander. β^* -konfiguriertes MC1S (= β^* -MC1S) weist jedoch im System TEC bzw. CEC einen sehr ähnlichen hRF-Wert auf (48) wie Z-M4ES²(47) (vgl. dazu Klein, G., 1977) und läßt sich von diesem nicht abtrennen. α^* -konfiguriertes MC1S (= α^* -MC1S) chromatographiert in CEC und TEC wie E-M4ES. Im System BDE kann nun β^* -MC1S von Z-M4ES bzw. α^* -MC1S von E-M4ES getrennt werden, jedoch cochromatographiert α^* -MC1S mit Z-M4ES (Klein, G. 1977.). D.h. β^* -MC1S und E-M4ES können im System BDE eindeutig identifiziert werden; für die Unterscheidung von α^* -MC1S und Z-M4ES ist ein zusätzlicher Lauf im System CEC oder TEC notwendig. (vgl. Abb. 8).

Das beim analytischen bzw. "präparativen" Chromsäureabbau aus gereinigtem HCL-PCBdme entstehende Imid mit hRF 48 (in TEC) wandert auch im Mischchromatogramm in den Systemen CEC, TEC und BDE wie β^* -MC1S (Abb. 8); die Annahme eines β -konfigurierten Chlorsuccinimides lag daher nahe. Die Identität des Imides hRF 48 mit β^* -MC1S konnte durch weitere Reaktionen bewiesen werden.

¹ Den Substituenten an einem chiralen C-Atom wird eine unterschiedliche "Wertigkeit" zugeordnet, d.h. der Substituent mit der größten Atommasse erhält die Priorität 1, der mit der zweitgrößten Masse die Priorität 2 u.s.f.. Blickt man so auf das Molekül, daß der "leichteste Substituent" nach hinten zeigt, so ist ein Molekül dann R konfiguriert, wenn die Substituenten im Uhrzeigersinn in der Reihenfolge 1, 2, 3, 4 stehen, S konfiguriert wenn die Abfolge 1→4 entgegen dem Uhrzeigersinn verläuft. Optische Antipoden lassen sich nur durch Verwendung chiraler Verbindungen trennen. In der DC unterscheidet sich daher RRR- bzw. SSS-konfiguriertes Imid nicht.

² Die Bezeichnung Z bzw. E bezieht sich auf die Konfiguration der Doppelbindung, vgl. Abb. 8)

1.3.2.3. Eliminierung von HCl aus den diastereomeren Chlor-succinimiden und dem Imid hRF 48

1.3.2.3.1. Eliminierung von HCl in methanolischem Ammoniak

α^* und β^* -konfigurierte MCLs sind gegenüber Säuren stabil, eliminieren aber schon mit verdünntem Ammoniak stereospezifisch zu den M Δ ES. (Klein, G., 1977, Klein, G. und Rüdiger, W., 1978) β^* -MCLs eliminiert zu Z-M Δ ES, α^* -MCLs zu E-M Δ ES, wobei die Geschwindigkeit der Elimination bei letzterem doppelt so hoch ist. (Klein, G., 1977)

Durch präparativen Chromsäureabbau aus HCl-PCBDme gewonnenes Imid mit hRF 48 (TEC) wurde durch DC zuerst im System TEC dann im System BDE aufgereinigt. Ein Aliquot des aufgereinigten Imides wurde parallel mit authentischem α^* bzw. β^* -konfiguriertem MCLs 1 h in 1-3 M/l methanolischem Ammoniak inkubiert. Anschließend prüfte man in der DC mittels beider Fließmittelsysteme auf Eliminierungsprodukte. Nach 1 h war die Eliminierung von α^* -MCLs zu E-M Δ ES vollständig, bei dem Ansatz mit β^* -MCLs ließ sich noch etwas Ausgangsmaterial nachweisen. Aus dem Reaktionsansatz mit dem Imid hRF 48 extrahierte man ebenfalls 2 Imide, die sich in der DC in den Systemen TEC bzw. BDE wie β^* -MCLs bzw. sein Eliminierungsprodukt Z-M Δ ES verhielten (Abb. 8). Bei der Cochromatographie in beiden Systemen wanderte sowohl das Imid hRF 48 mit β^* -MCLs als auch das durch basenkatalysierte Reaktion erhaltene Imid mit Z-M Δ ES. Das heißt also, daß das Imid mit hRF 48 tatsächlich mit β^* -MCLs identisch ist. Dieses Ergebnis wurde durch die Eliminierung in wässrigem NH_3 und durch das neu entwickelte Verfahren der "Analytischen Eliminierung" bestätigt.

1.3.2.3.2. Eliminierung von HCl in wässrigem Ammoniak und "Analytische Eliminierung auf der Platte"

Um noch mehr Sicherheit über die Identität von Imid hRF 48 zu gewinnen, wurde sein Eliminierungsverhalten im Vergleich mit β^* -MCLs in wässrigem Ammoniak (1.3 N; Schoch, S. et al. 1978) und "analytisch" auf der Platte geprüft. Die Reaktionszeit betrug 1 h bzw. 5' bei der analytischen Eliminierung. Bei der

analytischen Eliminierung hielt man eine Platte mit den punktförmig aufgetragenen Imiden für 5' in eine Ammoniak-Atmosphäre und chromatographierte nach dem vollständigen Verjagen des überschüssigen Ammoniaks im Fließmittel BDE¹. Die Vorteile der "analytischen Eliminierung" liegen insbesondere im geringer Zeit- und Substanzaufwand. Außerdem kann diese Methode bei einer 2-dimensionalen Entwicklung angewendet werden: die aus einem Bilin durch Chromsäureabbau entstandenen Imide können in der 1. Dimension aufgetrennt werden und nach Behandlung mit NH₃-Dampf in der 2. Dimension auf ihre Eliminierungsprodukte geprüft werden.

Sowohl bei der Elimination mit wässrigem Ammoniak als auch bei der "analytischen Elimination" verhält sich das Imid aus dem HCl-PCBdme mit hRF 48 wie -MClS: beide Imide eliminieren zu Z-M4ES. Das Imid hRF 48 ist also ein B-MClS. Da, anders als bei synthetischen Imiden, bei dem aus dem Bilinchromophor stammendem Imid die Konfiguration am C1 und C2 als R festgelegt ist (der proteingebundene Chromophor ist all-R-konfiguriert, vgl. z.B. Klein und Rüdiger, 1978), folgt daraus zwingend eine S-Konfiguration am C2' (synthetisches B-MClS besteht aus RRS-MClS und SSR-MClS, Klein und Rüdiger, 1978). Das Imid hRF 48 ist also ein RRS-konfiguriertes 3-Methyl-2-(2-Chlor-ethyl)-Succinimid und wird im folgenden als S-MClS bezeichnet. Das bedingt für den HCl-PCBdme eine Struktur gemäß Modell III (Abb. 4), wobei das C3' S-konfiguriert ist. Der HCl-Chromophor stellt also in Beziehung auf das C3' ein gegenüber dem Protein-S-PCB invertiertes Produkt dar (Abb. 9)

¹ Die vollständige Vertreibung von Ammoniak ist wichtig, da sonst bei der Visualisierung mit Chlor/TMB eine starke Hintergrundfärbung auftritt. Die Verwendung von TMB-Lösung mit katalytischem KJ-Zusatz ist ungeeignet (starke Hintergrundfärbung)

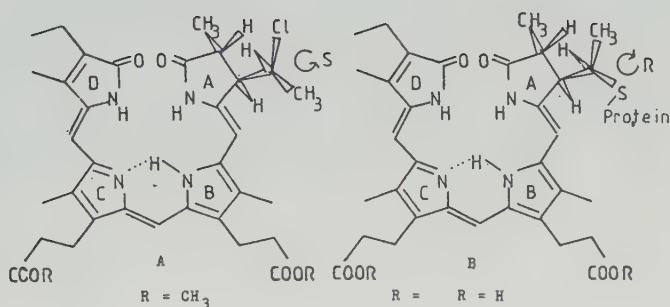


Abb. 9

Struktur des HCl-PCBdme

HCl-PCBdme stellt ein Chlorsubstituiertes

PCBdme mit S-Konfiguration am C 3' dar

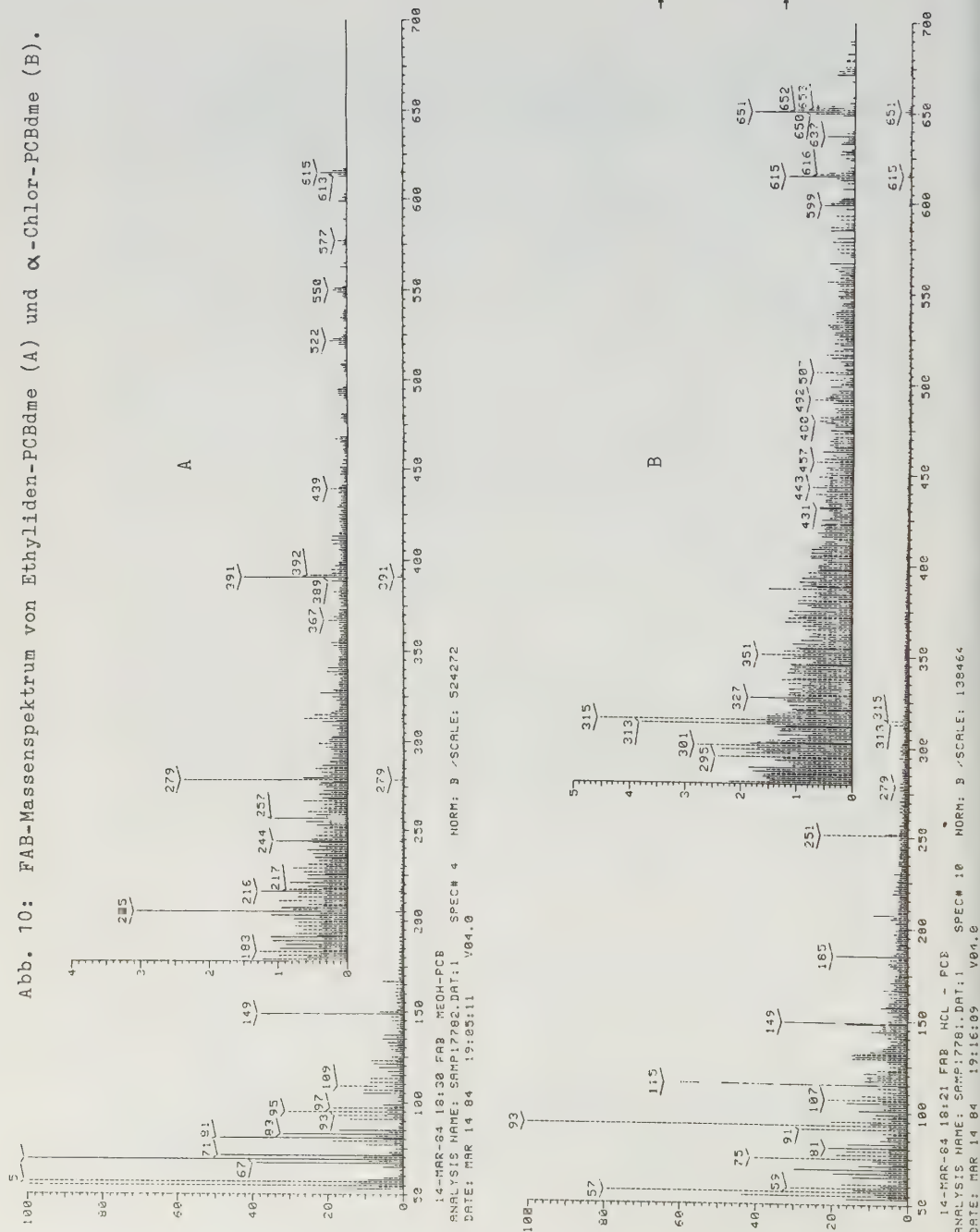
(= S-Chlor-PCBdme). (A). Die Konfigura-

tion des proteingebundenen PCB an C3' ist

≠ (B).

Ob die über den Ring D an das Protein gebundenen Phycocyanobilin-Chromophore (Bishop et. al., 1986) durch HCl abgespalten werden wurde nicht weiter untersucht. Hinweise auf an Ring D (C18) mit Chlor substituierte Chromophore fehlten jedoch.

Abb. 10: FAB-Massenspektrum von Ethylen-PCBdme (A) und α -Chlor-PCBdme (B).



1.4. Massenspektrum von S-konfiguriertem α -Chlor-PCBdme und E-PCBdme

Die aufgrund der Chromsäureabbauten hergeleitete Struktur des HCl-PCBdme als 'Additionsprodukt PCBdme plus HCl' konnte auch auf der Ebene des Chromophordme durch ein FAB-Massenspektrum bewiesen werden. Bei FAB-Massenspektren (FAB = Fast Atom Bombardement) erhält man auch bei relativ instabilen Molekülen einen deutlich erkennbaren Massenpeak, während die Fragmentation etwas unterdrückt wird. Wie Abb. 10 zeigt erhält man, wie erwartet, bei E-PCBdme einen Massenpeak von 615, bei HCl-PCBdme Massenpeaks bei 651 und 653, deren Intensitäten sich zudem wie 3 : 1 verhalten und die natürliche 3 : 1-Verteilung von $^{35}\text{Chlor}$ zu $^{37}\text{Chlor}$ widerspiegeln. Der Unterschied in den Masseneinheiten von E-PCBdme und HCl-PCBdme ist mit 36 wie für eine formale HCl-Addition erwartet. Der bei dem HCl-PCBdme zusätzlich noch auftretenden Peak bei 615 dürfte auf die thermische Eliminierung von HCl zurückzuführen sein.

1.5. Identifikation von Methanol-Co als C3'-R-konfigurierter α -Chlor-PCBdme

1.5.1. Chromatographische Eigenschaften von "Methanol-Co"

Bei der Abspaltung des Chromophors mit HCl entsteht, wie erwähnt, neben dem schon charakterisierten 3'-S-Chlor-PCBdme ein blaues Bilin (=Methanol-Co). Im Mischchromatogramm ließ sich dieser Gallenfarbstoff auch auf HPTLC-Platten nicht von E-PCBdme trennen (Abb. 2), wenn auch manchmal bei Verwendung des Fließmittels A ein wenig strukturierter Doppelfleck zu sehen war. Der subjektive Farbeindruck der beiden Pigmente ($\text{hRF/TE} = 64$; $\text{hRF/A} = 54$) auf der Platte war gleich, allerdings blich E-PCBdme etwas schneller aus.

1.5.2. Spektraldaten von Methanol-Co

Ein HCl-Rohextrakt dme wurde mit Fließmittel TE entwickelt und Methanol-Co (hRF 64) eluiert. Im UV-Vis-Spektrum in saurem Methanol zeigte sich im Gegensatz zu authentischem E-PCBdme (Abb.3)

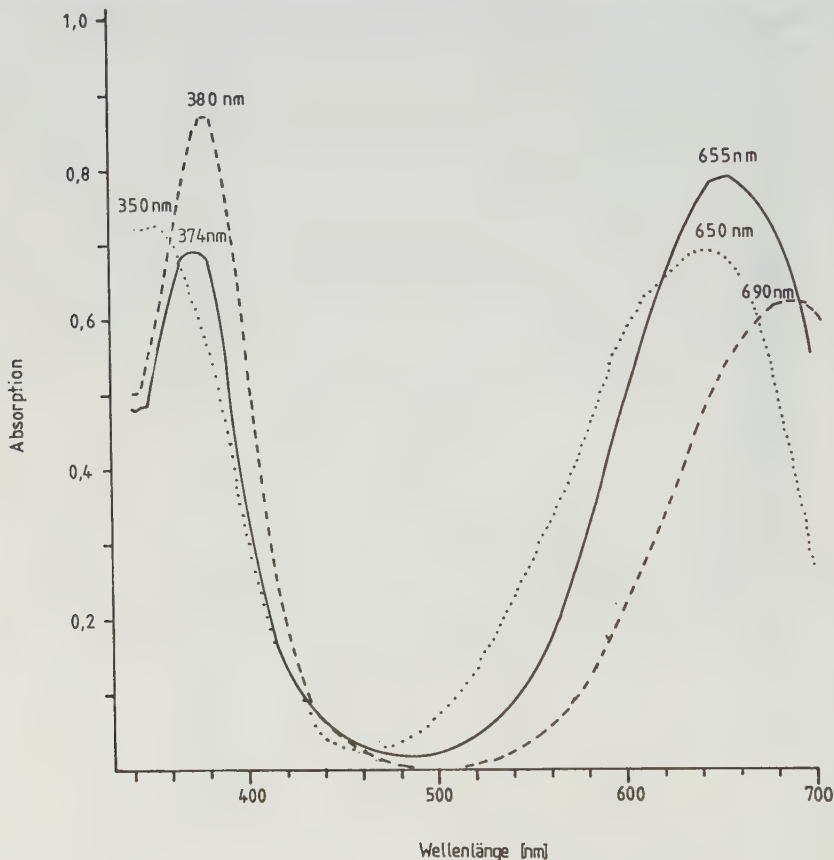


Abb. 11

R-Chlor-PCBdme (—) absorbiert bei 655 nm bzw. 374 nm, also etwas längerwellig als der Rohextrakt (.....) (650 nm/350 nm). Die Maxima von R-Chlor-PCBdme sind bezüglich der Maxima von Ethylden-PCBdme (E-konfiguriert: 690 nm/380 nm; -----) im langwelligen Bereich um 35 nm verschoben. (Lösungsmittel: Methanol/H₂SO₄)

statt einer symmetrischen Bande mit einem Maximum bei 690 nm eine Verbreiterung der Absorptionsbande zu tieferen Wellenlängen. Das langwellige Maximum lag bei 685 - 690 nm, das kurzwellige bei 378 nm. Beide Maxima entsprachen damit den Maxima von E-PCBdme. Nach erneuter Chromatographie in TE trennte sich zwar keine andere Bande ab, die Peakverbreiterung im roten Spektralbereich war jedoch verschwunden. (vgl. 1.1.9)

Einen grundsätzlich anderen Befund erhielt man bei der DC des HCl-Rohextrakt dme in Fließmittel A: Der eluierte, blaue Bilindme mit hRF 54 absorbierte in saurem Methanol jedoch, vgl. oben bei 655 nm und 374 nm (Abb. 11). Damit ähnelt das Spektrum des durch DC in ausschließlich Fließmittel A gereinigten Methanol-Co stark dem Elektronenspektrum von 3' S-Chlor-PCBdme (645 nm/340nm; Abb. 3); der gereinigte Methanol-Co absorbiert etwas langwelliger als der HCl-Rohextrakt-dme und um 35 nm kürzer als E-PCBdme.

1.5.3. Chromsäureabbau von Methanol-Co

1.5.3.1. Chromsäureabbau von in Fließmittel A gereinigtem Methanol-Co (hRF = 54)

Durch die spektralen Daten des in Fließmittel A gereinigten Methanol-Co (hRF 54) wurde in Analogie zum bereits identifizierten S-Chlor-PCBdme eine "formale" Addition an die Ethylidengruppe des Ringes A nahegelegt. Die Art des Substituenten (Chlor- oder Hydroxy, vgl. 1.1.2.2.) bzw. seine Position (angular oder in α -Stellung) konnte durch den Chromsäureabbau bestimmt werden.¹ Das neben MEM, HSE bzw. HS (hRF in CEC = 70, 53, 0) aus Methanol-Co entstandene Imid (hRF 41 in CEC) wanderte auch im Misch-

¹ Chromsäureabbau des Bilindme bzw. die weitere Charakterisierung des Imides hRF 41 erfolgte analog der Identifizierung des Imides 48 vgl. Pkt. 1.3.2.ff.

B D E													T E C												
MEM													MEM												
HSE													HSE												
β^1 -MCLIS													β^1 -MCLIS												
α^2 -MCLIS, Z-MAES													α^2 -MCLIS, Z-MAES												
E-MAES													E-MAES												

Abb.: 12 Identifizierung des Imides aus Methanol-Co als R-MCIS durch Vergleich mit authentischen ^{*}Q-MCIS und Eliminierung mit Ammoniak

BUE

234

- | | | | | |
|----|---|--|---|--|
| 1 | 1 = Chromsäureabbau von E-PCBdme | 2 = Chromsäureabbau von Methanol-Co (TE) | 1 = Chromsäureabbau von E-PCBdme | 2 = Chromsäureabbau von Methanol-Co (TE) |
| 3 | 3 = Chromsäureabbau von Methanol-Co (A) | 4 = Chromsäureabbau von S-konf. Chlor-PCBdme | 3 = Chromsäureabbau von Methanol-Co (A) | 4 = Chromsäureabbau von S-konf. Chlor-PCBdme |
| 5 | 5 = 2 + E-MJES | 6 = 3 + E-MJES | 5 = 2 + Z-MJES | 6 = 3 + Z-MJES |
| 7 | 7 = 2 + α^* -MJCS | 8 = 3 + α^* -MJCS | 7 = 2 + α^* -MJCS | 8 = 3 + α^* -MJCS |
| 9 | 9 = 3 + 1.3 N NH ₃ | 10 = 9 + E-MJES | 9 = 3 + 1.3 N NH ₃ | 10 = 9 + Z-MJES |
| 11 | 11 = α^* -MJCS | 12 = β^* -MJCS | 11 = α^* -MJCS | 12 = β^* -MJCS |
| 13 | 13 = E-MJES | 14 = 2-MJES | 13 = E-MJES | 14 = 2-MJES |

chromatogramm in CEC wie E-M4ES bzw. α^* -MCLs. Im System BDE trennte sich das Imid von authentischem E-M4ES ab, wanderte aber nach wie vor zusammen mit authentischem α^* -MCLs (Abb.12)

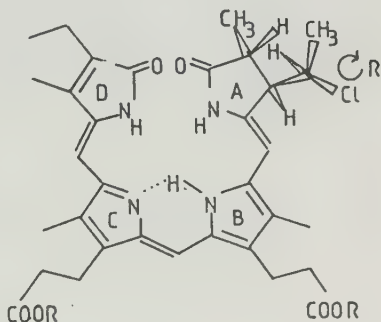
Bei Inkubation mit methanolischem Ammoniak entstand aus diesem Imid - wie auch aus R-MCLs - E-M4ES. Damit war seine Identität mit R-MCLs bewiesen, die absolute Konfiguration ist RRR, da im Bilin die Konfiguration an C1 und C2 festgelegt ist. Also muß, wie im Imid, auch im Bilindme am C3' ursprünglich eine R-Konfiguration vorgelegen haben. Der als Methanol-Co bezeichnete Gallenfarbstoff stellt folglich das 3'R-Chlor-PCBdme dar (Abb. 13). Er ist also diastereomer zu dem bereits identifizierten 3'S-Chlor-PCBdme und weist die gleiche Konfiguration auf wie der proteingebundene Chromophor.

Abb. 13

Struktur von Methanol-Co

Das in α -Stellung mit Chlor substituierte PCBdme ist am C3 R-konfiguriert.

R = -CH₃



¹ Außer diesem Imid fanden sich Spuren von E-M4ES (ob Verunreinigung des Bilindme mit E-PCBdme oder sorbenskatalysierte Eliminierung wurde nicht untersucht.

1.5.3.2. Chromsäureabbau von in Fließmittel TE gereinigtem "Methanol-Co"

Das bei der DC in Fließmittel TE erhaltene blaue Pigment war nicht von authentischem E-PCBdme zu trennen. Nach zweimaliger Rechromatographie war das UV-Vis-Spektrum identisch mit dem von E-PCBdme. Der Chromsäureabbau des jetzt vorliegenden Produktes ergab dasselbe Imidmuster wie E-PCBdme. Das isolierte Pigment stellt folglich E-PCBdme dar. Das bedeutet, daß je nach dem verwendeten Fließmittel unterschiedliche Produkte erhalten werden: während bei der DC-Reinigung des Rohextraktdme in Fließmittel A hauptsächlich die diastereomeren α -Chlor-PCBdme isoliert werden konnten, erhält man bei Verwendung von TE als Fließmittel S-konfigurierten α -Chlor-PCBdme und E-PCBdme. Das bedeutet aber, daß wie auch bei den entsprechenden MC1S die α -Chlor-PCBdme sorbenskatalysiert HCl eliminieren (vgl. dazu Klein, G., und Rüdiger, W. 1978). Das Phänomen der sorbenskatalysierten Umwandlung der α -Chlor-PCBdme wird der Übersichtlichkeit halber unter Punkt 1.9 beschrieben.

1.6. Abschätzung der Mengenverhältnisse von R- und S-konfiguriertem α -Chlor-PCBdme

Da eine Bestimmung des Extinktionskoeffizienten der α -Chlor-Chromophore aufgrund ihrer Instabilität bei der DC nicht möglich war, können keine absoluten Mengen angegeben werden. Es werden jedoch keine signifikanten Unterschiede im Extinktionskoeffizienten der beiden diastereomeren Biline erwartet, d. h. durch Messung der Extinktion sollte zumindest das Verhältnis der beiden α -Chlor-PCBdme zu bestimmen sein.

¹ PCBdme und α -Chlor-PCBdme absorbieren im Neutralen bei ca. 600 nm.

Eine in Fließmittel A entwickelte Platte eines HCl-Rohextraktdme wurde densitometrisch ausgewertet (Filter: 598 nm¹).

(Integrale der Hauptpeaks: 5,5 : 1,6 : 1 gleich S-Chlor-PCBdme : Methanol-Co : Z-PCBdme). Da die α -Chlor-PCBdme zu den Z- und E-PCBdme eliminieren (vgl. Punkt 1.9), wurde folgendes postuliert, um die Mengenverhältnisse abschätzen zu können:

- die Extinktionskoeffizienten von Z- und E-PCBdme sowie R- und S-konfigurierten α -Chlor-PCBdme unterscheiden sich nicht signifikant
- R-Chlor-PCBdme eliminiert stereoselektiv zu E-PCBdme (vgl. 1.9.)
- S-Chlor-PCBdme eliminiert 1 : 1 zu E- bzw. Z-PCBdme (vgl. 1.9.)

Unter den oben aufgeführten Postulaten errechnet sich ein ursprüngliches Verhältnis von S-Chlor-PCBdme zu R-Chlor-PCBdme von 1 : 1.5.

Bei dieser Art der Bestimmung wird die Menge an S-Chlor-PCBdme wohl etwas überschätzt, während bei der folgenden Bestimmung die Menge an R-Chlor-PCBdme zu hoch angesetzt wird: Nach der Chromatographie eines HCl-Rohextraktdme (Fließmittel A) errechnet sich anhand der UV-VIS-Spektren der eluierten Zonen mit hRF 66 (S-Chlor-PCBdme) ein Verhältnis von 2,4 : 1 für R-konfigurierten : S-konfiguriertem α -Chlor-PCBdme. Einen ähnlichen Wert, 2-3 : 1 = R- : S-konfiguriert, erhält man auch, wenn man die Intensität der aus dem Ring A stammenden Imidflecken vergleicht.

1.7. Ausschluß eines angularen Chlorsubstituenten

Durch die unter 1.3.2.3 bzw. 1.5.3.1. beschriebene, stereospezifische HCl-Eliminierung der aus den betreffenden Bilindme erhaltenen MClS kann ein angularer Chlorsubstituent ausgeschlossen werden. Ein angular substituiertes Bilin kann nur durch einen Eliminierungs-Additionsmechanismus entstanden sein, d.h. das Chlor könnte im Prinzip sowohl in trans- als auch in cis-Stellung zum angularen Proton an C2 addieren (IA= cis, IIA = trans in Abb. 14) Durch die Addition eines weiteren Protons an das C3' wird dieses Chiralitätszentrum aufgehoben, d.h. aus Z- und E-PCBdme entstehen die gleichen Produkte IA und IIA. Für das Eliminierungsverhalten der aus beiden PCBdme durch Chromsäureabbau entstehenden, angular substituierten Chlor-Succinimide (IA' und IIA') lassen sich folgende Voraussagen machen: In der Form IIA' ist eine planare Einstellung des Chlorsubstituenten sowohl zum Proton an C3'¹ (syn-koplanar) als auch zum Proton an C2' (syn- bzw. anti-koplanar) möglich. Durch anti-koplanare Elimination entsteht ein Succinimid (C1-C2'H), durch syn-koplanare Elimination C1-C3H ein Maleinimid (MEM). In Form IA' ist dagegen eine völlige planare Einstellung nur zwischen dem Proton an C2' und dem angularen Chlor möglich, eine planare trans-Einstellung zum C3-gebundenen Proton muß aufgrund der Ringgeometrie erschwert sein. Bezüglich der Bildung von Maleinimiden gilt daher: aus IIA' sollte durch syn-Elimination auch MEM (neben den Succinimiden) gebildet werden, während aus Form IA' bevorzugt die Succinimide gebildet werden sollten². Bezüglich der Succinimide gilt folgendes: da die Drehung um die C2-C2'-Achse nicht erschwert ist, wird die Eliminierung antikoplanar (= trans) erfolgen. Da die an C2' gebundenen Wasserstoffe gleichberechtigt sind, führt die Eliminierung gleichberechtigt zu 2 Produkten, nämlich Z- und E-MdES und zwar sowohl aus der Form IIA' als auch IA'. Da aber die Imide hRF 48 bzw. 41 ausschließlich Z- oder E-MdES liefern, muß der Chlorsubstituent an C3' gebunden sein.

¹ C3 im Bilin entspricht C2 im Imid

² vgl. die rasche syn-Eliminierung von HCl aus den in Bezug auf die vicinalen Chlorsubstituenten-Trans-Dichlor-Norboran gegenüber der langsamen, sterisch gehinderten anti-Eliminierung aus den cis-Dichlor-Norboranen, Christen, R. 1973

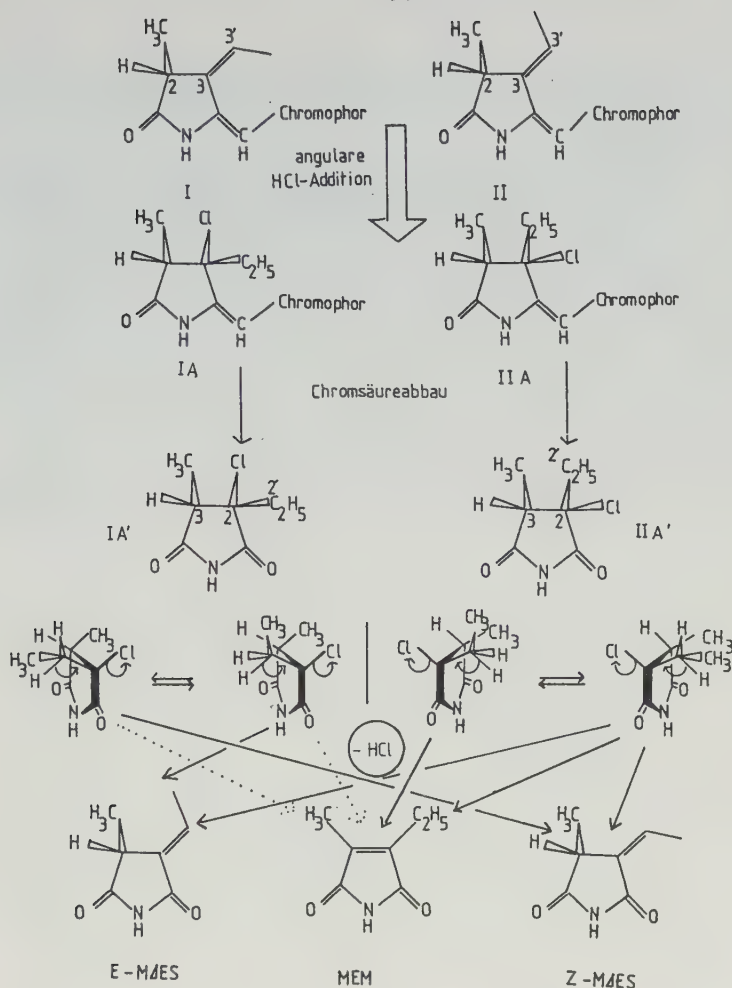


Abb.: 14

Bei angularer Addition von Chlorid (C 3) an Z- und/oder E-PCBdme (I bzw. II) sind bei unterschiedlicher Additionsrichtung zwei diastereomere Chromophore zu erwarten; bei IA stehen Chlor und C2-Methyl cis, bei IIA trans. Der Chromsäureabbau würde die entsprechenden Succinimide liefern: IA' bzw. IIA'. Durch basenkatalysierte Eliminierung von HCl entstünde sowohl aus IA' als auch aus IIA' Z- und E-MdEs, da die Drehung um die C2-C2'-Achse nicht eingeschränkt ist und daher die Eliminierung der einzelnen C2'-gebundenen Protonen gleichberechtigt ist. Eine planare Einstellung zu angularen C3-gebundenen Proton ist nur bei IIA' möglich (synkoplanar), während bei IA' durch die Ringspannung eine antiperiplanare Stellung der beiden Abgangsgruppen nicht möglich ist. Die zu MEM führende Eliminierung von HCl wird daher, wenn überhaupt, bei IA' sehr viel langsamer verlaufen.

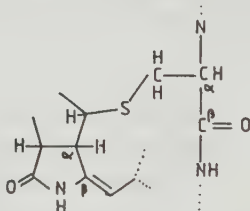
1.8. Überlegungen und Versuche zum Reaktionsablauf: Diskussion von Substitutions- bzw. Eliminations-Additions-Mechanismen

1.8.1. Diskussion der möglichen Reaktionsmechanismen unter Einbeziehung der stereochemischen Konsequenzen

Nachdem die bei der Abspaltung mit HCl entstandenen Hauptpigmente, R- bzw. S-konfiguriertes PCBdme, identifiziert worden waren, stellte sich die Frage nach ihrer Bildung. Beim Phycocyanin-Protein handelt es sich um einen aliphatischen Thioether, der mit einem sekundären (Bilin) bzw. primären (Aminosäure = Cystein¹) Kohlenstoff verknüpft ist. Jeweils β -ständig zu den Brücken-Kohlenstoffen findet sich eine Doppelbindung (Bilinchromophor) bzw. eine Säureamidfunktion (Cystein) (Abb. 15). Im Allgemeinen

Abb. 15

In β -Stellung zu den Brücken-C findet sich eine Doppelbindung (Bilin) bzw. eine Säureamidfunktion (Protein)



gilt, daß Thioether gegenüber Protonsäuren wie HCl, HBr oder HJ sowie Lewissäuren weniger reaktiv sind als die Sauerstoffanalogen (Brandsma, L. und Arens, J.F. 1969). Das ist möglicherweise dadurch bedingt, daß durch die Größe des Schwefelatoms ein effektives Überlappen der Orbitale mit denjenigen des Protons bzw. dem elektronendefizienten Atom der Lewissäure erschwert ist (Brandsma, L. und Arens, J.F. 1969). Aus diesem Grund ist normalerweise bei einfachen aliphatischen Thioethern kein dem Oxoniumion analoges Sulfoniumion intermediär nachweisbar. Jedoch bildet z.B. Dimethylsulfid bei niedrigen Temperaturen mit HJ ein Addukt, das beim Erhitzen Methyljodid abspaltet. Die Spaltung der Bilin-Protein-Thioethers gelingt aber schon

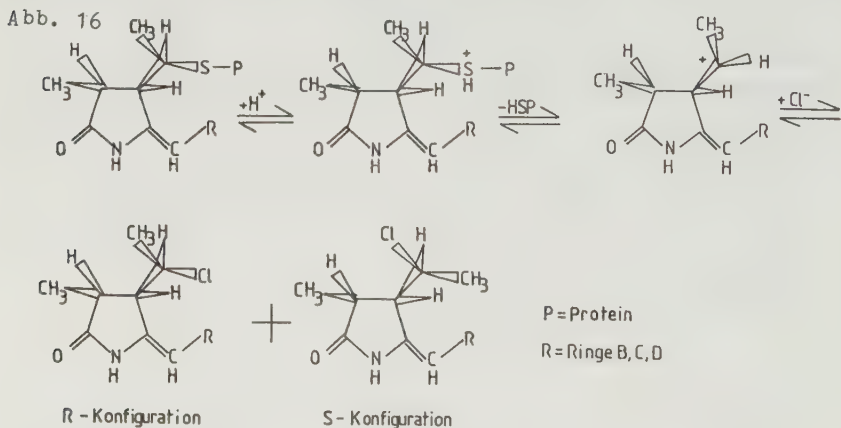
¹ Nachweis von Cystein als bindende Aminosäure, Köst-Reyes, E. und H.-P. Köst, 1979 und siehe Einleitung)

durch die schwächere Säure HCl auch bei sehr niedrigen Temperaturen, vgl. Punkt 7.2.2.1. oder durch einfaches Erhitzen mit Methanol bzw. höheren Alkoholen (Beuhler, R.J. et al., 1976). Gerade die nach Brown et al. (1979) normalerweise nicht zur Thioetherspaltung führende Alkoholyse, die bei Biliproteinen den Chromophor in relativ guten Ausbeuten spaltet¹ und die schnelle, (10 Min.) 100%ige Abspaltung mit HBr in TFA (Schram B.L. und Kroes, H.H., 1971; Rüdiger, W. et al. 1980) bei Raumtemperatur sowie die Etherpyrolyse im Vakuum (Fu, E. et al, 1979) deuten darauf hin, daß die Thioetherbindung aktiviert ist. Die Tatsache, daß bei der Bilinabspaltung immer die C-S-Bindung des Bilins getrennt wird, läßt sich durch die größere Stabilität einer positiven (Teil)ladung am sekundären C erklären (vgl. auch Burwell, R.L., 1954 und Tartelt, D.S., 1951). In diesem Zusammenhang ist auch interessant, daß bei der Hydrolyse eines Phenylthiohydantoin-Cystein-Bilin-Komplexes auch Cystein abgespalten wird (Köst-Reyes, E. und Köst, H.-P., 1979), während unter diesen Bedingungen normalerweise durch β -Elimination Alanin freigesetzt wird (Edman, P. und Henschen A., 1975). Auch bei der basenkatalysierten Thioetherspaltung an Modellimidinen wird immer die C-S-Bindung am sekundären C gespalten (Klein, G., 1977, Schoch, S. et al., 1976; Klein, G. und Rüdiger, W., 1978). Nimmt man als ersten Schritt der Thioetherspaltung die Protonierung des S an, die möglicherweise durch Nachbargruppeneffekte des Proteins - vielleicht durch intramolekulare SN-Reaktion - erleichtert wird (vgl. die leichtere RSO_2 -Elimination mit Chromsäure im Fall $\text{R} = \text{Cystein}$ gegenüber $\text{R} = \text{Ethyl}$; Schoch, S. et al., 1976), so kann die Spaltung der C-S-Bindung entweder durch Substitution oder durch Elimination erfolgen.

¹ Chapman et al., 1986 beschreiben bei der Methanolyse eine Ausbeute von 10.3%, ermittelt durch die Absorption von nicht denaturiertem PC und der Absorption des extrahierten Chromophors in Chloroform. Da aber die Absorption des Chromophors bei Denaturierung des Proteins bzw. dessen Abspaltung sehr stark sinkt ($E = 15\ 000$ für freie, $E = 100\ 000$ für native, protein-gebundene Biline; Scheer, H., 1981) dürfte die reelle Ausbeute noch höher (20-30%) liegen.

1.8.1.1. Substitutionsmechanismen

Die säurekatalysierte Etherspaltung bei einfachen aliphatischen Thioethern läßt sich als Substitution durch das Halogenatom an der C-Funktion auffassen. Dabei reagieren primäre Thioether bevorzugt nach dem S_N2 -, tertiäre nach dem S_N1 -Mechanismus (Brandsma, L. und Arens, J.F., 1969). Daß nach der Abspaltung der Bilin-Chromophore mit HCl sowohl der R- als auch der S-konfigurierte α -Chlor-PCBdme isoliert werden kann, schließt die Substitution nach dem S_N2 -Mechanismus noch nicht zwingend aus, da, wie gezeigt (Schema 1, Pkt. I.3.) Ethyliden-PCBdme und α -Chlor-PCBdme sich ineinander umwandeln. Ein S_N1 -Mechanismus ist zwar aufgrund der Reaktionsbedingungen bzw. der Natur der Reaktanden wahrscheinlicher: Auf der einen Seite wird durch das polare Lösungsmittel HCl ein über ein Carbeniumion laufender Mechanismus begünstigt und die Gruppenehäufung kommt im bipyramidalen Übergangszustand einer S_N2 -Reaktion wesentlich stärker zum Tragen als im trigonal-planaren Übergangszustand einer S_N1 -Reaktion, andererseits ist das Chloridion nur ein mittelstarkes Nukleophil. Die Reaktion wäre dann wie folgt zu formulieren (vgl. Köst, H.-P., 1975) (Abb. 16).



Abspaltung des Bilins durch HCl nach dem S_N1 -Mechanismus: Nach der Protonierung des Schwefels und der Abspaltung von HS-Protein entsteht ein nicht resonanzstabilisiertes, frei drehbares Carbeniumion; die Addition von Chlorid führt daher zu den diastereomeren α -Chlor-PCBdme mit S- bzw. R-Konfiguration am C 3'.

1.8.1.2. Eliminationsmechanismus

Neben einem Substitutionsmechanismus könnte man sich die Abspaltung des Bilins auch als Elimination (in Analogie zur säurekatalysierten Abspaltung von Alkoholen) vorstellen: auch hier stellt sich die Frage nach dem Reaktionsmechanismus. Die Elimination könnte entweder nach dem E₁-Mechanismus ablaufen oder einem "konzertierten E₂-Typus" folgen. Für einen E₂-Mechanismus gegenüber einer nach E₁ verlaufenden Elimination spricht einerseits, daß ein Übergangszustand wie A (Abb. 17) durch das konjugierte Bindungssystem des Chromophors stabilisiert wird, besonders, wenn man eine Laktimstruktur an Ring D annimmt (B, Abb. 17) und andererseits, daß die C-S-Bindung relativ schwer zu trennen ist. Ein in E₁ gebildetes Carboniumion (C in Abb. 17) kann jedoch nicht resonanzstabilisiert werden, was in gleicher Weise auch für das bei einer S_N-1-Reaktion gebildete Carboniumion gilt.

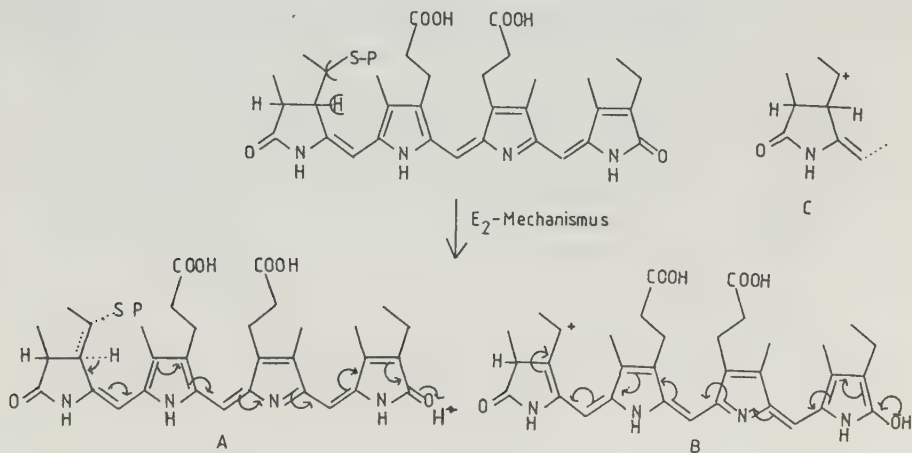


Abb. 17

Verläuft die Abspaltung des Bilins nach einem E₂-Mechanismus, so kann der Übergangszustand (A) durch mesomere Formen (z.B. Laktimstruktur am Ring D; B) stabilisiert werden. Eine derartige Stabilisierung ist bei einem Carboniumion C, das sowohl bei einer E₁-Eliminierung als auch bei einer S_N1-Substitution entsteht, nicht möglich.

1.8.1.3. Vergleich der Wahrscheinlichkeiten für eine Substitution und eine Elimination

Vergleicht man nun die Wahrscheinlichkeiten einer Substitution mit einer Elimination unter Abschätzung der für einen Thioether atypischen leichten Spaltbarkeit der C-S-Bindung (Brown, A. et al., 1979), so könnte man in der Ausbildung einer energiereichen konjugierten Doppelbindung an C3-C3', die zudem noch die Ringspannung im 5-gliedrigen Heterozyclus herabsetzt (Klein, G., 1977), die Triebkraft der Reaktion sehen: also eine Bevorzugung der Elimination gegenüber der Substitution. Die Bildung der α -Chlor-PCBdme wäre dann durch säurekatalysierte Addition an die exocyclische Doppelbindung zu verstehen. (Pkt. 1.9.1.5.). Eine derartige Addition an exocyclische Doppelbindungen, z.B. an Vinylgruppen wurde schon 1956 von Falk et al. bei Porphyrin beobachtet und als direkte HCl-Addition oder H₂O-Addition mit nachfolgender Esterbildung R-OH + HCl diskutiert.

1.8.1.4. Strukturelle Konsequenzen der verschiedenen Reaktionsmechanismen

Bei einer SN-2-Reaktion kann nur ein α -Chlor-Chromophor eintreten, und zwar bei einer absoluten Konfiguration des proteingebundenen Bilins mit 2R, 3R, 3'R-Konfiguration an Ring A (Klein und Rüdiger, 1979) nur der Chlor-PCB mit 2R, 3R, 3'S-Konfiguration. Bei einer SN-1-Reaktion sind dagegen die diastereomeren α -Chlor-PCBdme zu erwarten. Bei einem Eliminations-Additions-Mechanismus, sind, da die ionische Addition von HCl an eine Doppelbindung über ein Carboniumion verläuft, ebenfalls zwei diastereomere Chlorprodukte zu erwarten. Da aber der S-Chlor-PCBdme (vgl. Pkt. 1.9.) zu Z- und E-PCBdme eliminiert und andererseits Additionsreaktionen an die Doppelbindungen beschrieben sind (vgl. 1.8.5.1.) ist auch ein SN₂-Mechanismus nicht völlig auszuschließen. Die Frage nach dem Reaktionsmechanismus kann also aufgrund von stereochemischen Kriterien nicht endgültig beantwortet werden.

1.8.1.5. Addition von HCl an E-PCBdme

In der Literatur werden mehrere Additionsreaktionen an die exocyclische Doppelbindung von Porphyrinen oder Gallenfarbstoffen beschrieben, während die Addition an Succinimide unter sauren Bedingungen (HHal) nicht möglich ist, (Klein, G. 1977). So fand Falk 1958, wie erwähnt (1.8.1.3.) die säurekatalysierte Addition von H_2O und/oder HCl an die Vinylgruppe von Protoporphyrin, bei Fischer et al. ist die Addition von HBr an Hämin beschrieben (Fischer, H. und R. Müller, 1929; Fischer, H. et al. 1929). Rüdiger et al. fanden 1981 Indizien, daß bei Phytochromobilin im System HBr/TFA sowohl die Addition an die Vinylgruppe als auch an die Ethylidengruppe möglich ist. Beuhler et al. (1976) beschreiben ein durch HCl-Addition an PCBdme gebildetes, chloriertes PCBdme. O Carra und E HEocha (1966) geben an, daß durch die Behandlung eines durch Methanolyse gebildeten "blue pigment" (d.h. PCB) mit HCl eine hypsochrome Spektralverschiebung auftritt. Die von den Autoren angegebenen Spektraldaten dieses Gallenfarbstoffes (in der zitierten Arbeit als "Phycocyanobilin" bezeichnet) entsprechen denen des HCl-PCBdme. Betrachtet man den Chromophor nun als einfaches konjugiertes Polyen, so wird eigentlich bei der ionischen Addition von HCl das Markownikoff-Produkt, also ein angular substituierter Chromophor erwartet. PCBdme wurde nun unter Licht- und Luftabschluß bei Raumtemperatur mit 12 N HCl inkubiert. Spektren im Reaktionsgemisch zeigten bereits nach 10' eine spektrale Verschiebung der nahen UV-Bande von 388 nm (PCB) zu 384 nm (α -Chlor-PCBdme), was als Indiz für eine sehr rasche Reaktion gelten kann; im sichtbaren Bereich stellte man, wie erwartet¹, keine Absorptionsänderung fest. Die extrahierten Pigmente² wiesen in saurem Methanol statt 384 nm/688 nm (PCB) nun Maxima bei 358 nm/658 nm auf; dabei war auch der UV/VIS-Quotient kleiner geworden. Die hypsochrome Verschiebung der Absorptionsmaxima beweist eine Verkürzung des konjugierten Systems. (Abb. 18). In der DC der wiederveresterten Pig-

¹ α -Chlor-PCB und PCB absorbieren in HCl konz. bei 660 nm, im UV bei 384 nm bzw. 388 nm

² nach 1 h in HCl konz. liegen die Biline als freie Säuren vor

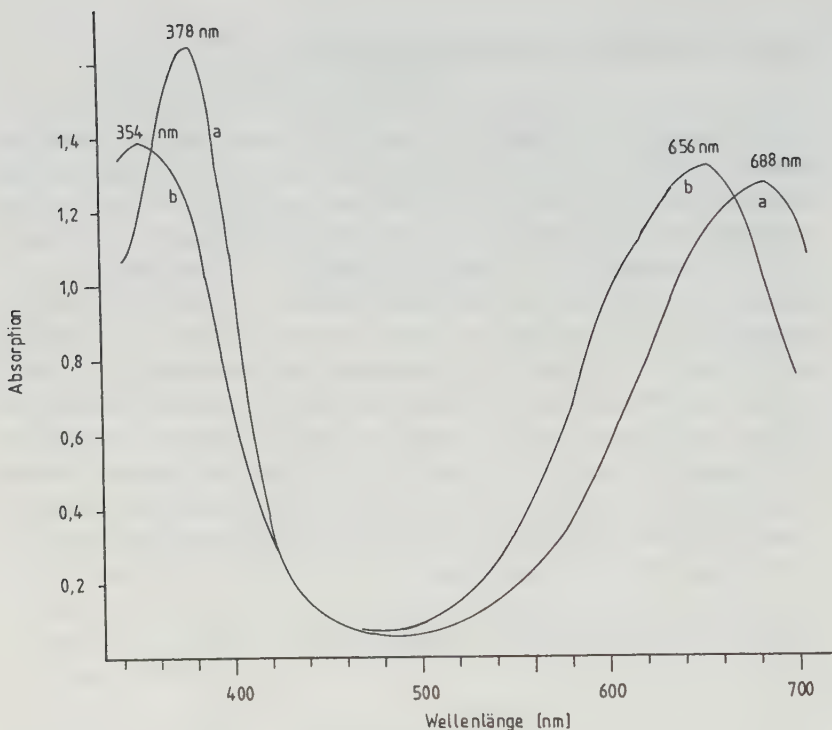


Abb. 18

Nach 1-stündiger Inkubation von Ethyliden-PCBdme (Kurve a in Methanol/ H_2SO_4) in HCl conc. sind die Maxima der wieder extrahierten Biline durch die Addition von HCl an die exocyclische Doppelbindung von 688 nm/378 nm (Ethyliden-PCBdme) zu 656 nm/354 nm verschoben (Kurve b)

mente zeigte sich, daß sich aus dem E-PCBdme nahezu quantitativ zwei Bilindme gebildet haben, die sich in der DC wie R- und S-konfiguriertes α -Chlor-PCBdme verhalten (Abb. 19). Die durch Chromsäureabbau des Reaktionsgemisches neben HS, HSE und MEM gebildeten Imide (Abb. 20) chromatographierten wie α^* und β^* MCLs. Sowohl die entstandenen Bilindme als auch die korrespondierenden Imide stehen mit ca. 1 : 3 für β^* konfiguriert : α^* konfiguriert im annähernd gleichen Verhältnis wie die nach Abspaltung vom Protein gebildeten Chromophore (Abb. 19 und 20). Es hat also tatsächlich eine HCl-Addition in Anti-Markownikoff-Orientierung stattgefunden. Nimmt man die eingangs erwähnte Verschiebung des kurzwelligen Maximums (388-384) als Marker für die Addition, so verläuft diese zudem äußerst schnell ($t < 10'$).

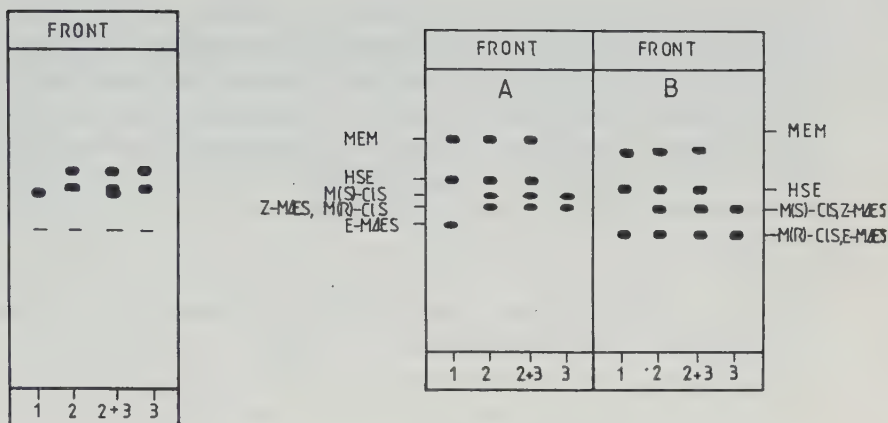


Abb. 20

Abb. 19

Die Analytische DC in FA zeigt, daß Ethyliden-PCBDme mit HCl konz. zu zwei Gallenfarbstoffen reagiert, die mit R- bzw. S-konfiguriertem α -Chlor-PCBDme cochromatographieren.

- 1 E-Ethyliden-PCBDme
- 2 E-Ethyliden-PCBDme + HCl konz.
- 3 S- bzw. R-Chlor-PCBDme

Der Chromsäureabbau der Reaktionsprodukte von Ethyliden-PCBDme mit HCl konz. liefert neben MEM, HSE und HS R- und S-konfiguriertes α -Chlor-Succinimid.

A Fließmittel BDE

B Fließmittel TEC

1 Ethyliden-PCBDme

2 Ethyliden-PCBDme + HCl konz.

3 α^R und α^S konfiguriertes Chlor-succinimid

Die nicht erwartete Additionrichtung¹ läßt sich auf mehrere Arten diskutieren: Möglich wäre, daß ein angulares Carbeniumion durch - M-Effekte, z.B. der - allerdings sehr weit entfernten - Carbonylfunktion an Ring D destabilisiert würde und/oder die Addition von Chlorid an ein angulares Carboniumion sterisch gehindert wäre. Eine sterische Hinderung des senkrecht zum konjugierten System angreifenden Cl^- erscheint aufgrund der Tatsache unwahrscheinlich, daß das weitaus größere Thiولاتanion glatt an die endozyclische Doppelbindung von MEM angular addiert (Klein, G. 1977; Schoch, S.

¹ zum Ausschluß einer angularen Addition vgl. 1.7. und, daß in Analogie zu der stereospezifischen Addition an den Ring-C bei Succinimiden (Klein, G. und Rüdiger, W. 1978) nur ein Produkt erwartet wird.

et al, 1978). Eine andere Möglichkeit wäre eine 1,4-Addition (vgl. Abb. 21). In diesem Fall würde das Proton an C 5 addieren, gefolgt von der Addition des Chlorids an das positivierte C 3'; durch Isomerisierung der Doppelbindung entstünde dann das C3'-substituierte PCB. (Abb. 21). Es ist bekannt, daß die C-5 Methinbrücke eine relativ hohe (negative) Ladungsdichte aufweist (Scheer et al, 1982); es wird außerdem beschrieben, daß das C5

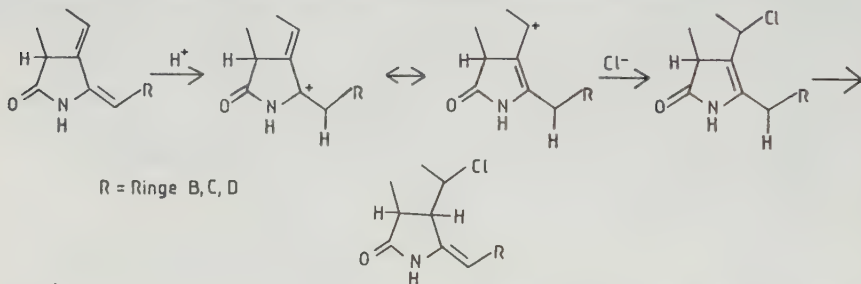


Abb. 21

1,4-Addition von HCl an das konjugierte Dien: das durch die Addition des Protons an C 5 entstandene Carbeniumion (C 4) könnte resonanzstabilisiert werden, z.B. durch "Verschiebung der positiven Ladung" an das C 3'. Durch Addition von Chlorid an C3', gefolgt von einer Protonenwanderung vom C 5 zum C 3 entsteht α -Chlor-PCBdme.

in D_2O einen Austausch von H gegen D zeigt (Lagarias et al. 1979). Unabhängig von der Erklärung einer Anti-Markownikoff-Orientierung bei der HCl-Addition an PCBdme zeigen die oben geschilderten Befunde, daß ein Eliminierungs/Additionsmechanismus durchaus möglich und mit den bei der Abspaltung des Bilins vom Protein auftretenden Produkten (R- und S-konfiguriertes, am C3' substituiertes PCB) zu vereinbaren ist. Ein derartiger Mechanismus ist jedoch noch nicht bewiesen.

1.9. Umlagerung der diastereomeren α -Chlor-PCBdme zu Z- und E-PCBdme

1.9.1. Chromsäureabbau eines HCl-Rohextraktes

Wie in Punkt 1.5.3. geschildert, unterscheidet sich die Zusammensetzung der Methanol-Co-Bande je nach dem zur Aufreinigung des HCl-Rohextraktdme verwendeten Fließmittels: bei Verwendung

des Systems TE bestand die Methanol-Co-Bande (hRF = 64) überwiegend aus PCBdme, bei Verwendung von System A jedoch aus R-Chlor-PCBdme und wenig PCBdme (hRF = 54). Das legt nahe, daß zumindest der Großteil des PCBdme erst sekundär bei der Chromatographie entstanden ist. Es wurde nun untersucht, ob in einem HCl-Rohextrakt dme überhaupt nachweisbare Mengen PCBdme zu finden sind. Da die α -Chlor-PCBdme während der DC sehr leicht eliminieren, wurde diese Frage anhand der Imide untersucht: fehlt PCBdme im Rohextrakt, so muß das entsprechende Imid E-M4ES auch im Chromsäureabbau fehlen¹. Es stellte sich nun tatsächlich heraus, daß durch präparativen Chromsäureabbau von HCl-Rohextrakt dme kein E-M4ES freigesetzt wurde, sondern zwei Imide, die mit α^* bzw. β^* -MClS cochromatographierten (Abb. 22), und unter Basenkatalyse (vgl. Pkt. 1.3.2.2.1.) zu Z- bzw. E-M4ES eliminieren (Abb. 22). Das Fehlen von E-M4ES steht im Ein-

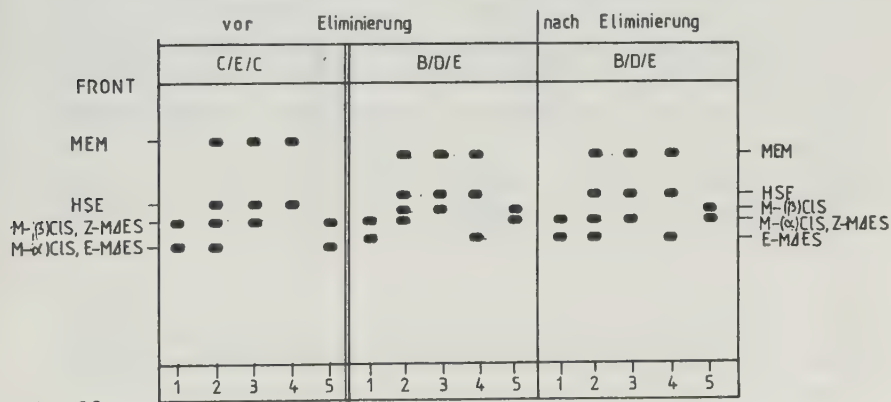


Abb. 22

Wird ein verestereter HCl-Rohextrakt mit Chromsäure abgebaut, so lassen sich in der analytischen DC nur α^* bzw. β^* -konfigurierte α -Chlorsuccinimide nachweisen, die durch basenkatalysierte Eliminierung von Chlorwasserstoff E- bzw. Z-MAES bilden.

1 = Z- und E-MAES 2 = Chromsäureabbau von HCl-Rohextrakt dme 3 = Chromsäureabbau von S-konfiguriertem α -Chlor-PCBdme 4 = Chromsäureabbau von Ethyliden-PCBdme (E-konfiguriert) 5 = α^* - und β^* -konfiguriertes α -Chlorsuccinimid.

¹ Bei dieser Untersuchung wurde vorausgesetzt, daß die Struktur am C 3 bzw. C 3' bei Umformungen des übrigen Systems erhalten bleibt, also z.B. bei der Bildung violinoider Produkte aus Chlor-PCBdme die violinoiden Pigmentdme noch mit Chlor substituiert sind.

klang mit den spektralen Daten des Rohextraktes; auch spektral ließ sich kein E-PCBdme nachweisen (vgl. Abb. 23), d.h. die Maxima im Rohextrakt dme liegen bei 350 nm/648 nm ohne Schulter bei 688 nm (Lösungsmittel: saures Methanol). Damit ist bewiesen, daß der Großteil des PCBdme erst bei der Chromatographie entsteht; die Umwandlung der chlorierten PCBdme zu den PCBdme sollte nun näher untersucht werden.

1.9.2. Umlagerung der α -Chlor-PCBdme während der DC

Wenn sich die α -Chlor-PCBdme während der DC durch Elimination zu den PCBdme umlagern, so sollte sich das im Spektrum der Bilindme vor und nach der Chromatographie auswirken. Wie Abb. 23 zeigt, liegt das Maximum des veresterten Abspaltungsgemisches vor der Chromatographie bei 648 nm bzw. 350 nm. Nach der Chromatographie¹ im Fließmittel TE (Tetrachlorkohlenstoff : Essigester = 1:: 1) hat sich das Maximum der Gesamtpigmentdme jedoch zu 684 nm bzw. 376 nm verschoben. Nach der Chromatographie im System A (Benzol : Petrolether : Methanol : Essigsäureethylester = 48,5 : 40,0 : 10,5 : 9,0) absorbieren die Gesamtpigmentdme bei 660 nm und 368 nm. Diese Veränderung der Spektren nach der Chromatographie (Abb. 23) beweist eindeutig, daß sich die Bilindme während der DC umlagern. Da die Maxima zu höheren Wellenlängen verschoben sind, muß auch das Konjugationssystem der Bilindme verlängert sein.

Wenn S- und/oder R-konfigurierter α -Chlor-PCBdme während der DC zu E- oder/und Z-konfiguriertem PCBdme umlagern, so sollte sich vor allem die Umlagerung des S-Chlor-PCBdme² in einer 2-dimensionalen DC nachweisen lassen.

¹ die Chromatographie zeigte das gewohnte Bild: eine schwächere Zone von S-Chlor-PCBdme, eine stärkere Zone Methanol-Co, sowie violinoide Nebenprodukte und geringe Konzentrationen an unveresterten Bilinen

² da R-Chlor-PCBdme und E-PCBdme in beiden Systemen (A bzw. TE) cochromatographieren läßt sich die Umlagerung dieses Chromophors mit diesen Fließmitteln nicht nachweisen.

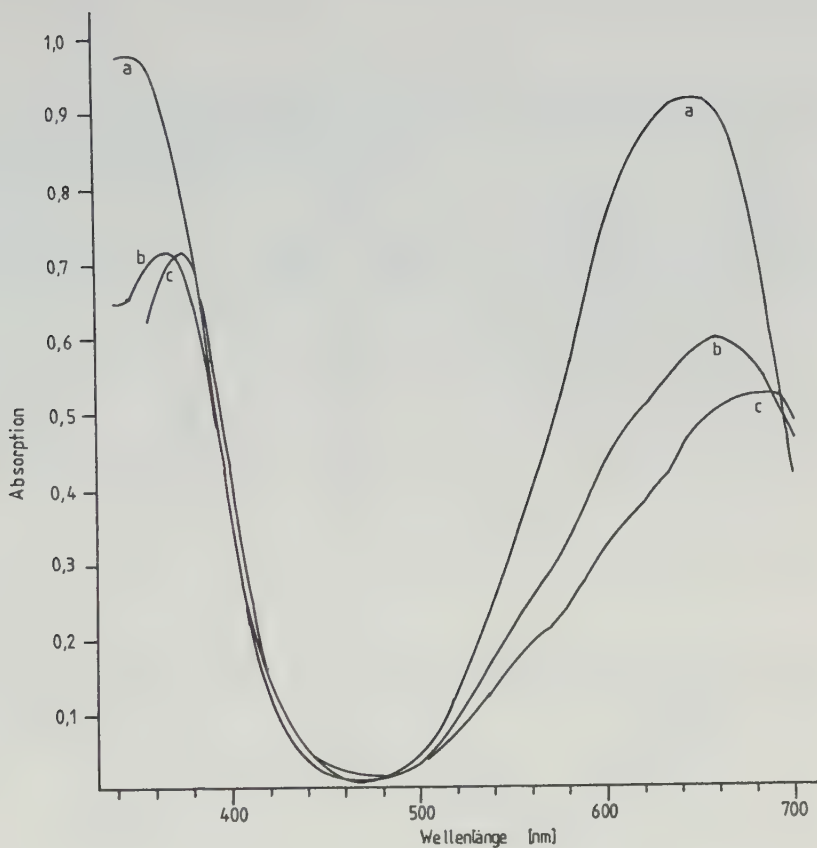


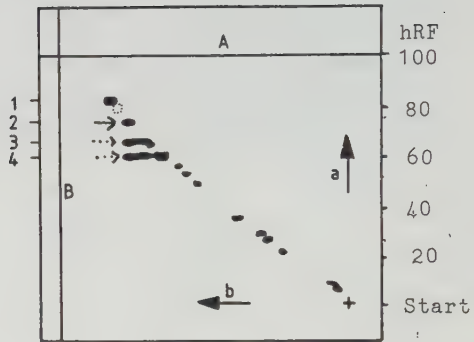
Abb. 23

Ein (veresterter) HCl-Rohextrakt absorbiert in Methanol/ H_2SO_4 bei 350 nm/ 648 nm (Kurve a). Nach der Chromatographie auf HPTLC-Platten (Kieselgel; Merck f. d. Nano-DC) in Fließmittel A (Kurve b) bzw. Tetrachlorkohlenstoff/Essigester (Kurve c) weisen die eluierten Gallenfarbstoffe in saurem Methanol Maxima bei 368 nm/660 nm bzw. 376 nm/684 nm auf.

Der HCl-Rohextrakt wurde in der ersten Dimension im Fließmittel TE chromatographiert, dann die Platte nach dem vollständigen Verdunsten des Fließmittels senkrecht zur ersten Dimension erneut in TE entwickelt. (Abb. 24). Bei dieser Technik finden sich alle

Abb. 24

Zweidimensionale Entwicklung (Fließmittel TE) eines mit HCl gewonnenen Pigmentrohextraktes. Die Pfeile a und b bzw. die Linien A und B markieren Richtung und Front der 1. Entwicklung (b, B) bzw. der 2. Entwicklung. Aus α -Chlor-PCBdme (2) → haben sich während der Chromatographie 2 Chromophore gebildet, die wie Z- bzw. E-PCBdme laufen (3 bzw. 4) → 1 = Methylphaeophorbid a).



unveränderten Pigmente auf der Diagonale zwischen dem Auftragspunkt und dem Schnittpunkt der beiden Fließmittelfronten, während umgelagerte Pigmente davon abweichen. Wie Abb. 24 zeigt, haben sich in der 2. Dimension aus dem S-Chlor-PCBdme zwei Chromophore abgespalten (hRF 72 und 64). Zusätzlich fällt auf, daß der S-Chlor-PCBdme nicht in einer scharfen Bande chromatographiert, sondern "schmiert". Es war zu erwarten, daß diese Schmierzone ebenfalls Umlagerungsprodukte (vgl. 1.10.3,3.) enthält. Neben den beiden blauen Bilindme (hRF 72 bzw. 64) fand sich eine grüne Bande zwischen beiden Pigmenten mit einem hRF von 69. Über den Flecken mit hRF 64 bzw. 72 (E- bzw. Z-PCBdme) fand sich ein schwacher Fleck mit hRF 80, der vielleicht S-Chlor-PCBdme darstellt.

Es ließ sich eindeutig nachweisen, daß aus S-Chlor-PCBdme während der DC zwei Pigmente gebildet werden, die sich hinsichtlich ihrer hRF-Werte wie Z- und E-PCBdme verhalten (hRF in TE für Z-PCBdme = 72, für E-PCBdme = 64)

1.9.3. Präparative Eliminierung der diastereomeren α -Chlor-PCBdme zu Z- und E-PCBdme

1.9.3.1. Versuch der Eliminierung mit ammoniakalischem Methanol

α -Chlor-PCBdme spaltet schon während der DC sehr leicht HCl ab, vergleichbar mit den ihnen entsprechenden α^* bzw. β^* -konfigurierten Chlorsuccinimiden (α^* -MCLs und β^* -MCLs) (Klein, G. und Rüdiger, W. 1978). Unter Basenkatalyse spalten α^* bzw. β^* -MCLs stereoselektiv und quantitativ Chlorwasserstoff ab, dabei eliminiert α^* -MCLs zu E-MAES, β^* -MCLs zu Z-MAES. Es lag daher nahe, zu untersuchen, ob die α -Chlor-PCBdme unter diesen Bedingungen ebenfalls stereoselektiv HCl abspalten. Überraschenderweise eliminieren aber weder der R- noch der S-konfigurierte Chlor-PCBdme in wässrigem oder methanolischen Ammoniak (1.3 Mol/l NH_3). Weder spektroskopisch noch durch analytischen Chromsäureabbau ließen sich E- bzw. Z-PCBdme oder die korrespondierenden Succinimide (Z- bzw. E-MAES) nachweisen.

Da sich eine sterische Hinderung der Abspaltung des Protons durch die kleine Base Ammoniak oder der planaren Einstellung der Abgangsgruppen ($\text{C3}'\text{-Cl}$ und angulares Proton) wohl ausschließen läßt, erscheint diese Resistenz gegen eine basenkatalysierte Eliminierung unerklärlich. Hier tritt aber ein weiterer Unterschied der α -Chlor-Bilindme zu den α -Chlor-Succinimiden auf: während letztere unter Basenkatalyse quantitativ eliminieren, jedoch keine Addition von HCl zeigen, verhalten sich die Biline gerade umgekehrt: es findet keine basenkatalysierte HCl-Elimination wohl aber eine säurekatalysierte HCl-Addition statt. Es ist zu vermuten, daß dieser Reaktivitätsunterschied in dem konjugierten π -Elektronensystem des Bilins zu suchen ist. Eine sterische Hinderung durch die übrigen Ringe der an der Peripherie des cyclisch-helicalen Systems ablaufenden Reaktionen ist weniger wahrscheinlich. Die unter neutralen bis schwach sauren Bedingungen auf Kieselgel G jedoch ablaufende Eliminierung¹ dürfte durch

¹ In stark saurem Milieu, wie bei der Extraktion der Pigmente (wässrige HCl bzw. H_2SO_4) bzw. der Veresterung ($\text{H}_2\text{SO}_4/\text{MeOH}$) wurde ebenfalls keine Elimination beobachtet.

das Kieselgel katalysiert zu werden. (vgl. Scheer 1985)

1.9.3.2. Nachweis von E-PCBdme als Eliminierungsprodukt von R-konfiguriertem Chlor-PCBdme

Da eine basenkatalysierte Eliminierung unmöglich war, wurde die Eliminierung während der DC zur präparativen Darstellung der Eliminationsprodukte aus R- bzw. S-Chlor-PCBdme ausgenutzt. In Fließmittel A¹ gereinigter S-Chlor-PCBdme bzw. R-Chlor-PCBdme (Spektren, DC der Bilindme sowie der Imide vgl. Abb. 25) wurden im Fließmittel TE rechromatographiert. Bei der Rechromatographie des S-Chlor-PCBdme erhält man Zonen mit hRF 80 (Hauptprodukt) und 64, sowie eine "Schmierzone". Spektroskopisch und in ihrem Imidmuster ist die Zone mit hRF 80 mit dem Edukt S-Chlor-PCBdme identisch. (Abb. 25). Bei der Rechromatographie des R-Chlor-PCBdme in TE erhält man 3 Zonen (hRF 80², 72² und 64), wobei das Bilin hRF 64 mit 90% das Hauptprodukt darstellt. Es absorbiert in saurem Methanol bei 378 nm/680-690 nm. Die spektrale Verschiebung läßt sich auch mit den durch den Chromsäureabbau freigesetzten Imiden korrelieren: während vor der Chromatographie aus Ring A in einem Verhältnis von ca. 9 : 1 R-MCl-S und E-MΔES entstanden sind, erhält man diese Imide nach der Chromatographie in dem umgekehrten Verhältnis. Damit ist erwiesen, daß die Bande mit hRF 64 zum Großteil aus E-PCBdme besteht, d.h. daß R-konfigurierter α -Chlor-PCBdme während der DC tatsächlich zu E-PCBdme eliminiert.

¹ in diesem System ist die Eliminierung wesentlich schwächer

² Die Zonen konnten aufgrund ihrer geringen Konzentration nicht, bzw. die Zone hRF 72 nur spektral analysiert werden (Absorption in saurem Methanol: 345 nm, 610 nm und 650-700 nm).

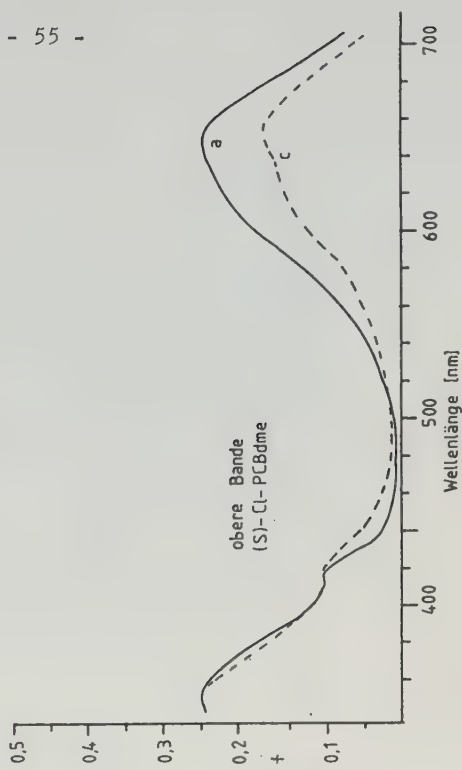
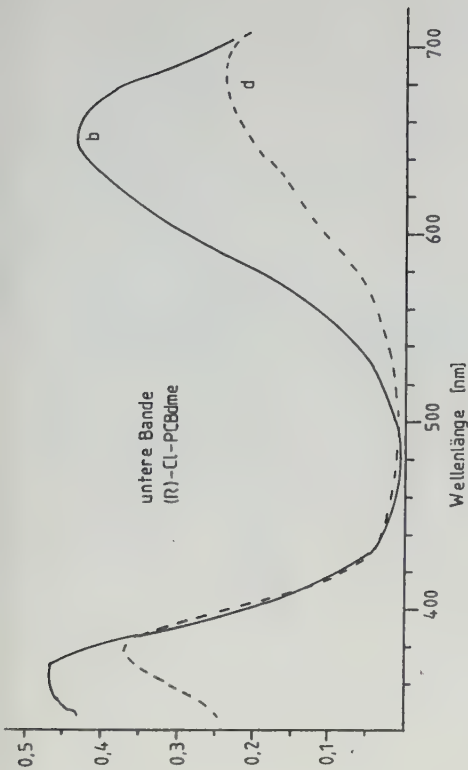
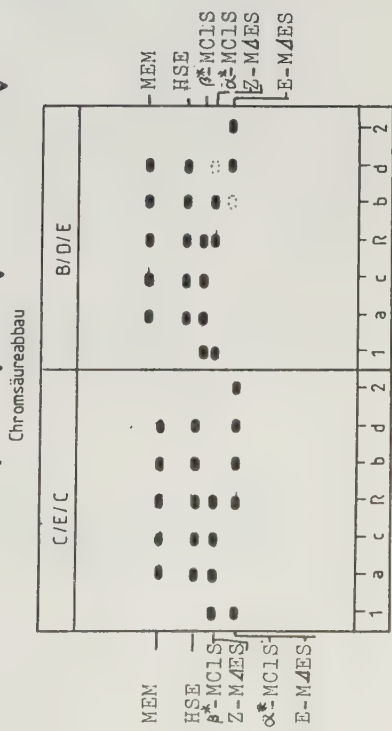
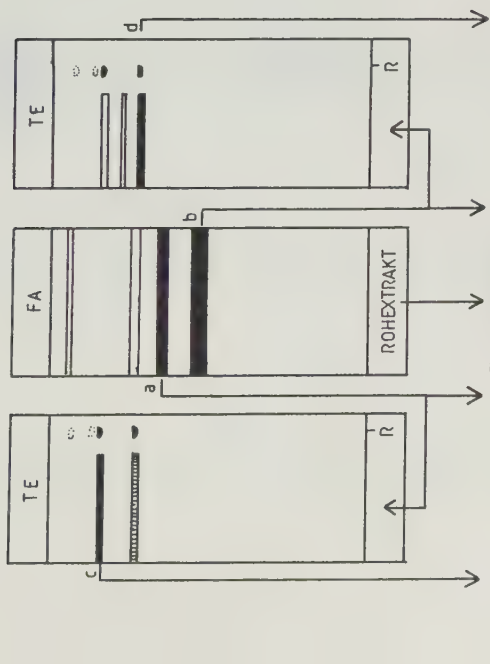


Abb. 25

Ein (veresterter) HCl-Rohextrakt wurde in Fließmittel A präparativ chromatographiert und der S-Chlor-PCBdme (a) sowie Zone b (Methanol-Co) herausgekratzt. Ein Aliquot wurde im Vergleich mit dem Rohextrakt (R) in dem Fließmittel TE chromatographiert und die Zonen c und d herausgekratzt. Das Spektrum von S-konfiguriertem α -Chlor-PCBdme (a) unterscheidet sich nur geringfügig von dem nach Chromatographie in TE isoliertem c, während R-Chlor-PCBdme (b) nach der Chromatographie in TE ein völlig verändertes Spektrum in Methanol/H₂SO₄ zeigt. Der Chromsäureabbau von a und c (S-Chlor-PCBdme vor und nach Chromatographie in TE) zeigt in der DC das gleiche Bild (MEM, HSE, S-Chlorsuccinimid). Der Chromsäureabbau von b (R-Chlor-PCBdme) liefert neben MEM und HSE, hauptsächlich R-Chlorsuccinimid neben Spuren von E-MdES. Nach der Chromatographie läßt sich jedoch im Abbaugemisch vor allem E-MdES neben Spuren von R-Chlorsuccinimid sowie MEM und HSE nachweisen.

1 α^* und β^* -Chlorsuccinimid 2 E-MdES a, b, c, d, R Chromsäureabbau der entsprechenden Pigmente und des Rohextraktes R.

1.9.3.3. Nachweis von Z- und E-PCBdme als Eliminierungsprodukte von S-konfiguriertem Chlor-PCBdme

Die bei einmaliger Entwicklung in TE auftretende "Schmierzone"¹ spaltet bei der Rechromatographie in TE in scharfe Banden auf: neben den Hauptbanden mit hRF 80, 72 und 64 tritt eine schwache, grüne Bande mit hRF 69 auf. Im Mischchromatogramm lief die Bande mit hRF 80 wie S-Chlor-PCBdme, die Bande mit hRF 72 wie authentisches Z-PCBdme², die Bande mit hRF 64 wie E-PCBdme.

¹ vgl. dazu die Aufspaltung von S-Chlor-PCBdme bei der 2-dimensionalen DC

² Z-PCBdme ist in größerem Maßstab aus der Spaltung von Phycocyanin mit HBr/TFA zugänglich (Rüdiger, W. et al. 1980)

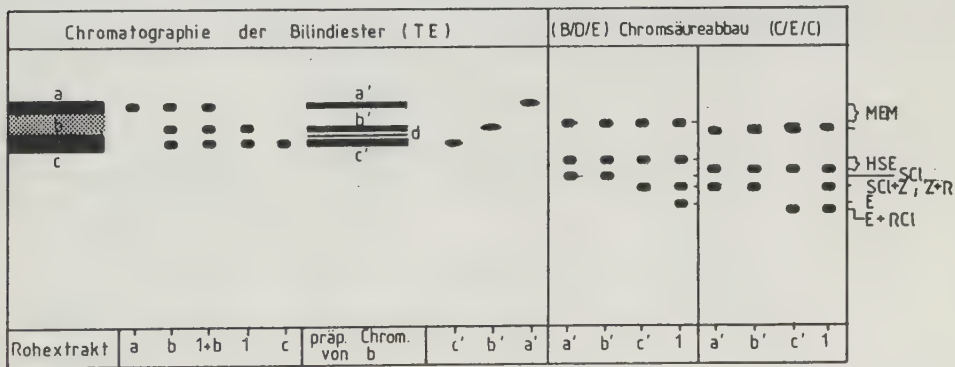
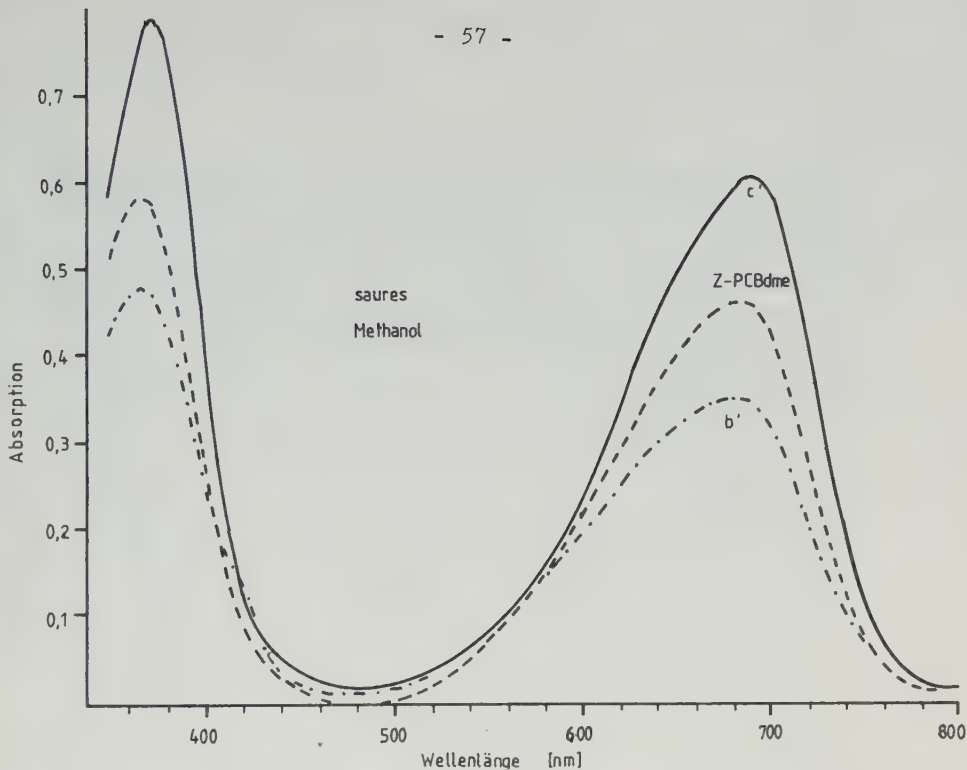


Abb. 26

Bei der Chromatographie eines HCl-Rohextraktes in Fließmittel TE tritt neben einer Zone von S-Chlor-PCBdme (a) und Ethylden-PCBdme (c) eine diffuse Zwischenzone (b) auf. Sowohl bei der analytischen DC, als auch bei der präparativen DC spaltet die Zwischenzone in distinkte Banden auf, wobei die oberste und die unterste Bande (a' bzw. b') wie S-Chlor-PCBdme (a) bzw. E-Ethylden-PCBdme (untere Bande von 1; c) chromatographieren. Die zusätzlich auftretende blaue Zone b' chromatographiert wie Z-Ethylden-PCBdme (obere Bande von 1). In der präparativen Chromatographie ist zusätzlich eine grüne Bande zwischen b' und c' zu erkennen. (d)

Der Chrmsäureabbau von a' liefert S-Chlorsuccinimid, der von b' Z-MZES, jeweils neben MEM und HSE. Spektral erweist sich eine Identität von c' mit E-Ethylden-PCBdme, bzw. von b' mit Z-Ethylden-PCBdme. (E-PCBdme und c' 378 nm/690 nm; b' und Z-PCBdme 370 nm/680 nm in Methanol/H₂SO₄).

a = S-Chlor-PCBdme b = Zwischenzone c = E-PCBdme von HCl-Rohextrakt 1 = z- und E-PCBdme

(Abb. 26). Spektral und im Imidmuster war das Bilin mit hRF 64 identisch mit E-PCBdme (Absorption in saurem Methanol 378 nm/690 nm; Imide wurden als MEM, HSE und E-M4ES identifiziert; Abb. 26), das Bilin hRF 72 war identisch mit Z-PCBdme (Absorption in saurem Methanol bei 370 nm/680 nm; Imide identifiziert als MEM, HSE und Z-M4ES). Die Eliminierung bei der Kieselgel-DC des S-konfigurierten Chlor-PCBdme liefert also im Gegensatz zu R-Chlor-PCBdme sowohl Z- als auch E-PCBdme und ist daher nicht stereospezifisch. In dieser Hinsicht verhalten sich die α -Chlor-PCBdme ähnlich wie die Sulfonyl-Succinimide, bei denen auch das β^* -konfigurierte Diastereomer sowohl weniger quantitativ als auch stereospezifisch eliminiert, (Klein, G. und Rüdiger, W., 1978). Die Autoren führen diese Tatsache auf eine sterische Hinderung der trans-Stellung der voluminösen Abgangsgruppe ($^-\text{SO}_2\text{-R}$) relativ zum angularen Ringproton zurück. Diese Hinderung tritt durch die geringere Raumerfüllung des Chlors bei Succinimiden jedoch nicht auf. Es wäre jedoch möglich, daß beim Chromophor durch die Methylgruppe des benachbarten Ringes B eine derartige Hinderung auftritt.

1. 10. Identifikation des grünen Pigmentes

Sowohl bei der 2-dimensionalen Chromatographie der veresterten Pigmente als auch bei der Rechromatographie der "Schmierzone" zwischen S-konfiguriertem α -Chlor-PCBdme und E-PCBdme erhält man eine grüne Bande (hRF ca. 70, vgl. Abb. 20 und 23). Eine entsprechende grüne Bande erhält man in verstärktem Maße bei wiederholter Inkubation von PC in HCl und bei der präparativen Eliminierung von R-konfiguriertem α -Chlor-PCBdme. Das Spektrum in saurem Methanol bzw. neutralem Chloroform ist mit den Maxima 648 nm/370 nm in Chloroform bzw. 685 nm/360 nm in saurem Methanol deutlich unterschiedlich von den bisher aufgeführten Pigmenten (Abb. 27). Da dieses Pigment vor allem bei wiederholter Inkubation in HCl bzw. bei wiederholter Chromatographie entsteht, kann man vermuten, daß es sich um ein Oxidationsprodukt

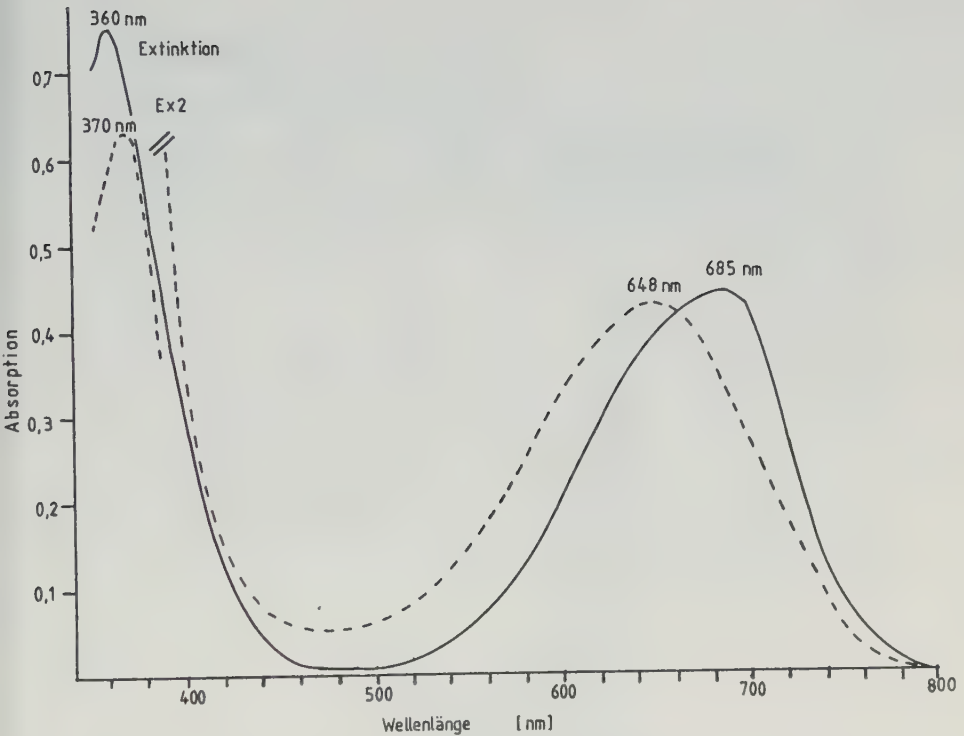


Abb. 27

Die Maxima der grünen Bande (hRF = 70) liegen in Methanol/H₂SO₄ bei 685 nm und 360 nm, in neutralem Chloroform (-----) bei 648 nm und 370 nm.

der "chlorierten" Bilindme handelt. Ein spektral und vom hRF-Wert her identisches Pigment wurde durch Einengen eines HCl-Rohextraktes bei erhöhter Temperatur (60° C in Butanol) erhalten. (Abb. 27). Das FAB-Massenspektrum zeigt einen Massenpeak bei m/e = 649 bzw. 651 mit der für Chlorverbindungen typischen Intensitätsverteilung Chlor 35 : Chlor 37 = 1 : 3, sowie einen wohl durch HCl-Elimination entstandenen, intensiven Peak bei m/e 613/614. Dies spricht für ein Pigment mit ungesättigtem Ring

Abb. 29
FAB-Massenspektrum des grünen Bilindme

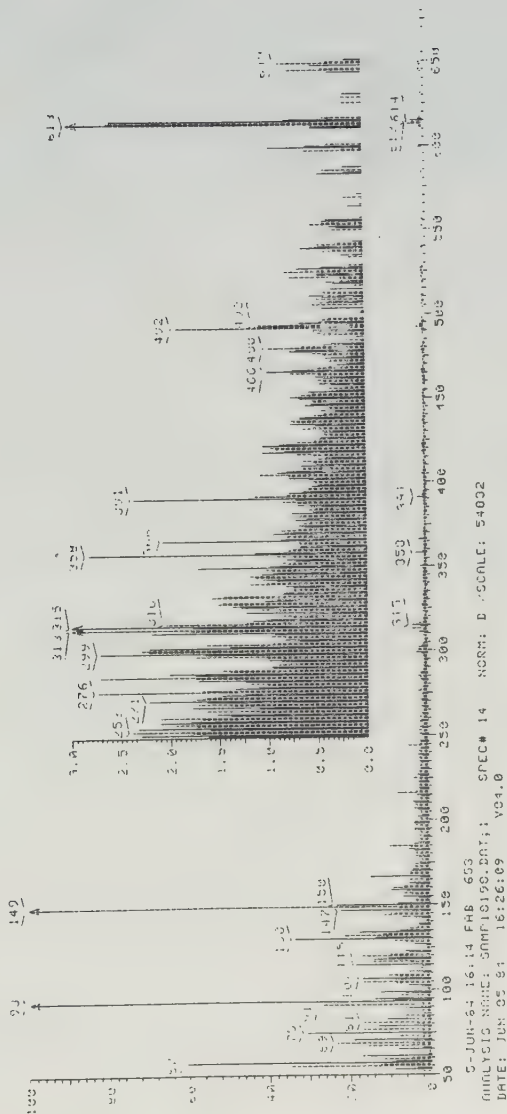
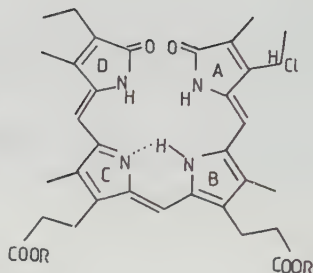


Abb. 30

Aufgrund der massenspektroskopischen und spektralen Daten wird für das grüne Bilin eine Struktur mit Chlorsubstituenten an C 3' und dehydriertem Ring A postuliert.



1.11. Abspaltung der Biline mit HCl- bzw. HBr-Gas

Nachdem gezeigt werden konnte, daß bei der Chromophorabspaltung mit Salzsäure sowohl R- als auch S-konfigurierte α -Chlor-PCB-dime entstehen, wurde nun untersucht, ob bei der Abspaltung des Bilins in TFA (Schram, B.L. und Kroes, H.H. 1977; Rüdiger, W. et al., 1980) ebenfalls halogensubstituierte Chromophore entstehen.

1.11.1. Abspaltung des Bilins mit HCl-Gas in TFA

Die Abspaltung des Chromophors mit HCl-Gas in TFA wurde zuerst analog der in der Literatur beschriebenen Methode (Schram, B. L. und Kroes, H.H. 1977; Rüdiger, W. et al., 1980) durchgeführt. Eine in Bezug auf HBr um ca. 75% verminderte Ausbeute erforderte jedoch ein Reaktionsdauer von einer Stunde statt zehn Minuten. Zusätzlich wurde das HCl-Gas über Phosphorpentoxid geleitet, um eine völlige Wasserfreiheit zu sichern. Nach einer Stunde Reaktionsdauer wurde die TFA mit Stickstoff abgelassen und die Reaktionsprodukte in Methanol aufgenommen. Mehrere Versuche hatten

gezeigt, daß durch vorherige Aufnahme in Methanol mit nachfolgendem Zusatz der methanolischen Schwefelsäure (Endkonzentration der Schwefelsäure 3%, w/w) rotgefärbte Produkte zurückgedrängt werden konnten. Zudem wurde durch diesen Schritt die Hauptmenge des Apoproteins abgetrennt. Wie bei der Abspaltung mit Salzsäure tritt auch hier weder im Abspaltungsgemisch in TFA noch bei späteren Schritten¹ die für E-PCBdme typische langwellige Absorption auf. Die Identität der Produkte mit denen der Abspaltung in Salzsäure konnte durch vergleichende DC der veresterten Pigmente sowie der durch Chromsäureabbau hieraus entstandenen Imide gezeigt werden. Durch die Abspaltung mit HCl-Gas wird zwar die Ausbeute an abgespaltenem Chromophor nicht signifikant gesteigert, jedoch die Dauer der Aufarbeitung wesentlich verkürzt und erleichtert. Da wasserfrei gearbeitet wird und das Lösungsmittel TFA durch Stickstoff leicht verdrängt werden kann, können die Gallenfarbstoffe direkt in Methanol aufgenommen und verestert werden. Eine vorherige Extraktion in Chloroform, die durch das Ausflocken des Proteins sowohl zeit- als auch produktraubend ist, kann unterbleiben.

1.11.2. Abspaltung der Chromophore mit HBr-Gas in TFA

Die Abspaltung der Biline mit HBr-Gas erfolgte analog der von Rüdiger et al. 1980 beschriebenen Methode. Die Aufarbeitung des Ansatzes wurde analog zu Punkt 1.11.1. durchgeführt. Wie auch bei der Abspaltung mit HCl-Gas tritt weder im Reaktionsgemisch in TFA noch bei den folgenden Schritten (Extraktion und Veresterung) das zu E-PCBdme gehörige Maximum auf. Das Fehlen von signifikanten Mengen an E-PCBdme läßt sich wie folgt belegen: Das Vorhandensein einer bei 688 nm absorbierenden Substanz (E-PCBdme) müßte als Minimum in der 2. Ableitung der Absorptionskurve erscheinen. Ein solches Minimum fehlt jedoch (Abb. 31). Aus dem Pigmentgemisch konnte eine violettblaue Zone mit hRF 80 (TEE) isoliert werden (Abb. 32), die sich mit den Maxima 644 nm (saures Methanol) und 590 nm (neutrales Chloroform) spek-

¹ Veresterung, Extraktion und Neutralisation

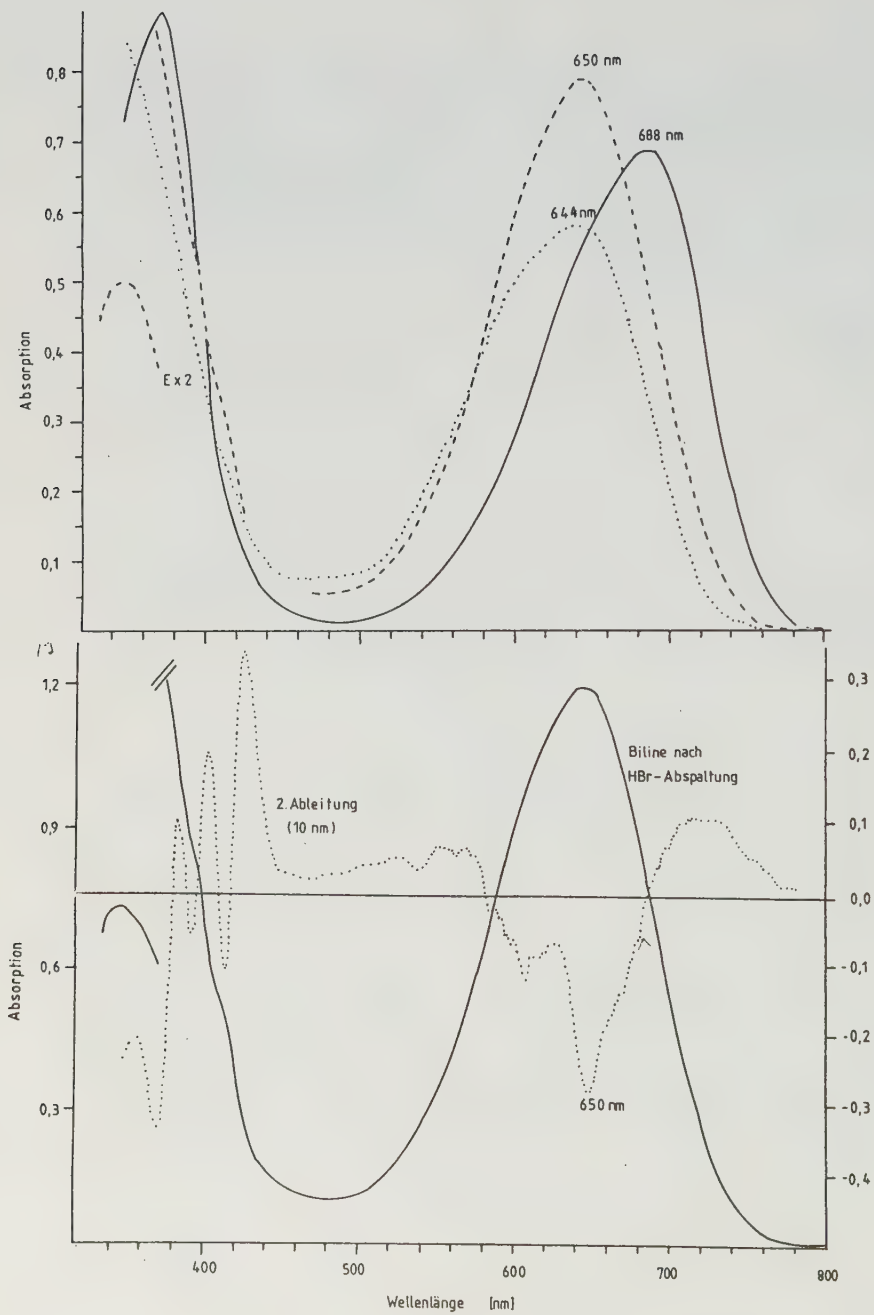


Abb. 31

Teil A:

Sowohl das durch HBr-katalysierte Abspaltung gewonnene Pigmentgemisch (---), als auch der chromatographisch gereinigte α -Brom-PCBdme (...)weisen in Methanol/ H_2SO_4 ein von Ethyliden-PCBdme (—) deutlich unterschiedliches Spektrum auf.

Teil B:

1 Spektrum des Pigmentbrhextraktes (linke Skala) 2 2. Ableitung von 1 (10 nm)
Die Ableitung (...) des Absorptionsspektrums (Pigmentgemisch nach HBr-katalysierter Abspaltung; in Methanol/ H_2SO_4 ; —) besitzt bei 648 nm - 650 nm ein Minimum, d.h. das Maximum des Absorptionsspektrums liegt bei 648 nm - 650 nm. Bei der für das Ethyliden-PCBdme typischen Absorption von 688 nm - 690 nm ist in der Ableitung nur eine minimale Schulter festzustellen, d.h. der Anteil von Ethyliden-PCBdme ist extrem gering.

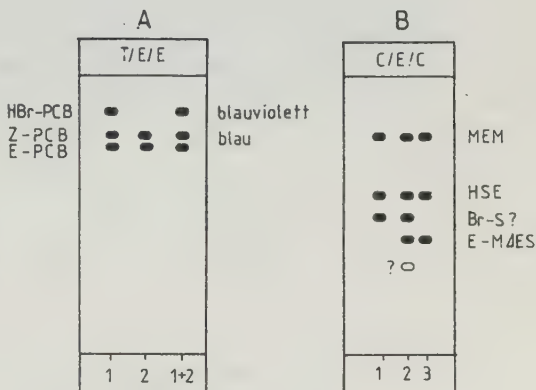
Abb. 32

Bei der analytischen DC eines HBr-Roh-extraktes findet man vor allem HBr-PCBdme, Z-PCBdme und E-PCBdme.

- 1 HBr-Rohextrakt
- 2 authentisches Z- (obere Bande) und E-PCBdme (untere Bande)

Bei dem Chromsäureabbau von α -Brom-PCBdme entsteht MEM, HSE und ein Imid mit hRF 58 (1). Der Rohextrakt liefert MEM, HSE, Imid hRF 58, ein mit E-MAES cochromatographierendes Imid sowie ein weiteres polares Imid.

- 1 Imide aus α -Brom-PCBdme
- 2 Imide aus dem HBr-Rohextrakt
- 3 Imide aus Methanol-PCBdme

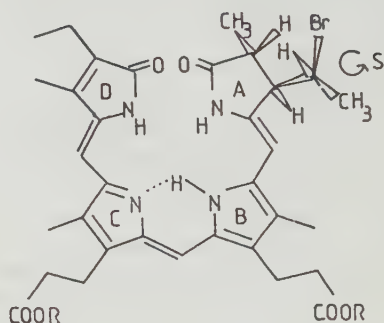


tral sehr ähnlich dem S-Chlor-PCBdme (Abb. 3') verhält. Nach dem Chromsäureabbau erhält man neben MEM und HSE ein Imid mit hRF 58 (TEC), das wohl das α -Brom-Analogon des 2'-S-Chlorsuccinimides darstellt (Abb. 32 B). Ein dem R-konfiguriertem Chlor-PCBdme analoges Br-PCBdme konnte bis jetzt noch nicht identifiziert werden, es ist aber wahrscheinlich, daß dieses Pigment ebenfalls entsteht, jedoch bei der DC zum E-PCBdme eliminiert. Eine bei den bromierten PCBdme relativ zu den chlorierten PCB-

dmegesteigerte Tendenz Halogenwasserstoff zu eliminieren war durch die geringere Dissoziationsenergie der Brom-Kohlenstoff-Bindung zu erwarten. Neben S-konfiguriertem Brom-PCBdme trat wieder eine Schmierzone sowie Z- und E-PCBdme auf (vgl. Rüdiger, W. et al. 1980). Aufgrund der experimentellen Daten wird für die Bande mit hRF 80 die in Abb. 33 gezeigte Struktur postuliert: das Pigment stellt ein an C3' mit Brom substituiertes PCBdme dar, wobei das C3' eine S-Konfiguration aufweist.

Abb. 33

Bei der Abspaltung des Bilinchromophors mit HBr in TFA entsteht neben Z- und E-PCB das an C3' S-konfigurierte α -Brom-PCB. R = H nach der Abspaltung bzw. CH₃ nach der Veresterung mit H₂SO₄/MeOH



1. 12. Untersuchung des durch Salzsäure abgespaltenen Proteins mittels SDS-Elektrophorese

Nachdem gezeigt werden konnte, daß bei der Abspaltung des Phycocyanin-Chromophors mit Salzsäure sowohl das R- als auch das S-konfigurierte α -Chlor-PCB entsteht, wurde nun das abgespaltene Protein mittels SDS-Elektrophorese untersucht. Es gelang, den nach der Extraktion des Bilins mit Chloroform an der Phasengrenze ausgefallenen, noch blau gefärbten 'Proteinkuchen' mit konz. Salzsäure zu lösen. Die Lösung wurde anschließend mit dem gleichen Volumen Merkaptoethanol (1 : 20 in dest. Wasser) versetzt und gegen wässriges Merkaptoethanol dialysiert; dabei entfärbt sich die Proteinlösung zusehends während die Dialyselösung sich schwach blau färbte. Nachdem Dialyselösung und Dialysat einen

pH von ca. 7 aufwiesen, wurde die proteinhaltige Lösung im Vergleich mit nativem PC unter denaturierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt.

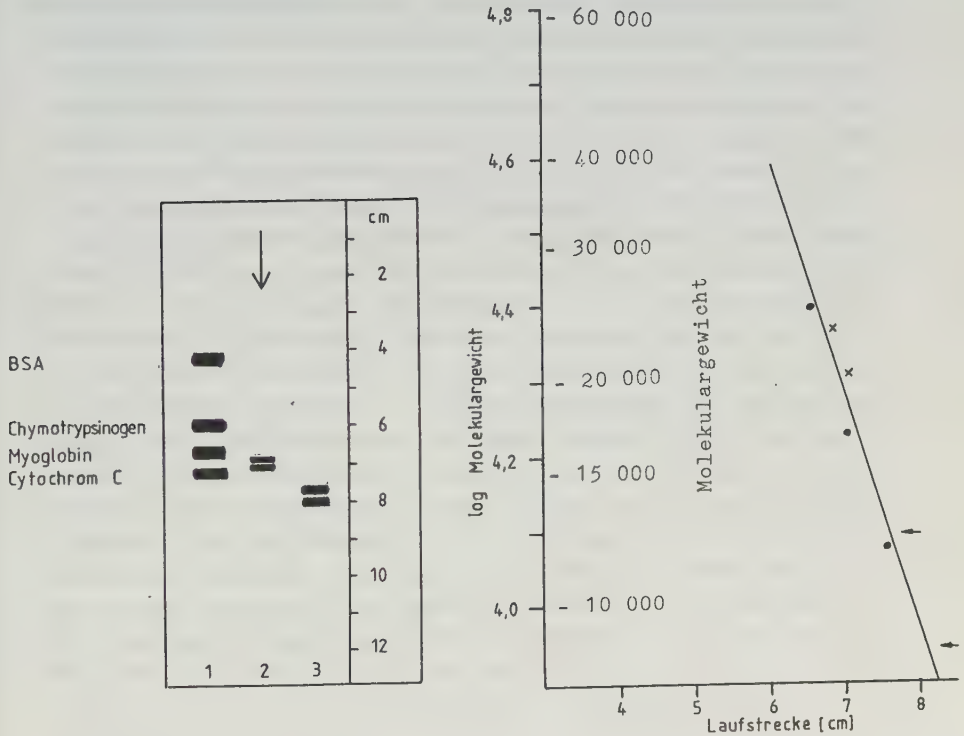


Abb. 34

Für die bei der Abspaltung des Bilins mit HCl erzeugten Polypeptide (3) aus Phycocyanin (2) ergibt sich durch ihr Laufverhalten bei der SDS-Elektrophorese (denaturierend; diskontinuierliche Polyacrylamid-Gele) ein ungefähres Molekulargewicht von 13 000 bzw. 9 000.

A: Ausschnitt aus dem SDS-Gel

1 = Eichproteine 2 = Phycocyanin 3 = Polypeptide

B: Eichgerade zur Ermittlung des Molekulargewichtes

• Eichproteine x PC-Untereinheiten (MG nach Boussiba, S. und Richmond, A, 1979:
20 500 und 23 500 für die α - und β -Untereinheit) → Polypeptide

Diese Elektrophorese führte man in einem kontinuierlichen Acrylamidgradienten durch. Wie die Abb. 34 zeigt, erhielt man im Fall von 'nativem' PC zwei Banden (α - und β -Untereinheit) mit Laufstrecken von 6,9 cm bzw. 7,1 cm; beim Dialysat traten bei allen getesteten Verdünnungen vor allem zwei intensive Banden mit Laufstrecken von 7,6 cm bzw. 8 cm auf. Während die Untereinheiten von 'nativem' PC auch ohne vorheriges Anfärben durch die blaue Farbe ihrer Chromophore sichtbar waren, waren die Banden des Dialysats erst nach dem Anfärben mit Coomassie Brilliant Blue sichtbar. In der Literatur werden für die α - und β -Untereinheit von PC aus Spirulina platensis Molekulargewichte von 20 500 bzw. 23 500 angegeben (Boussiba, S. und Richmond, A., 1979). Unter Einbeziehung der Laufstrecken von Eichproteinen ergibt sich damit ein ungefähres Molekulargewicht von 9500 bzw. 13 000 für die beiden aus dem Dialysat stammenden Banden. (Abb. 34 B). Damit sind diese Polypeptide in etwa halb so schwer als die Untereinheiten des 'nativen' PC und stellen damit kleinere Bruchstücke des "Apoproteins" dar. Die Tatsache, daß bei der Abspaltung mit Salzsäure überhaupt zwei definierte Hauptprodukten entstehen, könnte auf eine labile "Sollbruchstelle" im Proteinanteil des PC hinweisen. Durch schonendere Abspaltungsmethoden, wie z.B. die Abspaltung des Bilins mit HBr in TFA könnte vielleicht das "Apoprotein" abgespalten werden. Vorversuche in diese Richtung lassen eine Gewinnung von Apoprotein auf diesem Weg jedenfalls nicht völlig abwegig erscheinen, besonders, da auch bei der Peptidsynthese nach Merrifield die Benzylsäureester mit HBr gespalten werden. (Merrifield R.B. 1964)

2. Darstellung von Bilinthioether

Wie in der Einleitung erwähnt, ist der letzte Schritt der Biliproteinsynthese die Verknüpfung des farblosen Apoproteins (vgl. Steinmüller et al., 1982; Schuster, A. et al., 1983) mit einem Chromophor-Vorläufer. Als Vorläufer werden sowohl das von *Cyanidium caldarium* unter heterotrophen Bedingungen ausgeschiedene PCB (Troxler et al., 1978) diskutiert als auch ein sogenanntes A-Dihydrohalbmesobiliverdin (Köst, H.P. und Benedikt, E., 1982). Die Verknüpfung Apoprotein-Chromophor entsteht dann durch die Addition von Protein-SH an die Ethylidenfunktion (PCB) bzw. an die sehr reaktive Vinylgruppe (Köst, H. P. und Benedikt, E. 1982). Bei Inkubation von PCB in Ethanthiol bei Raumtemperatur oder unter Rückfluß entstehen Thioetherchromophore, die durch ihre Abbauprodukte, d.h. Sulfonylsuccinimide, charakterisiert wurden. (Klein, G. und Rüdiger, W., 1979). Außerdem wird die glatte, basenkatalysierte Addition von Thiolen an die Ethylidengruppe von Succinimiden beschrieben (Schoch, S. et al, 1974 und 1976; Klein, G. und Rüdiger, W. 1978, Klein, G. 1977). Im Hinblick auf die Biosynthese der Biliproteine ist die Regioselektivität der Additionsreaktion bemerkenswert: sowohl an das Succinimid als auch an PCB addiert ein Thiol in α -Stellung zum Ringsystem. Es wurde nun untersucht, ob Thiole auch unter Basenkatalyse regioselektiv an PCB addieren. Eine Polarisierung der Ethylidenfunktion nach dem Vinylogieprinzip (= positive Ladung an dem α -C) wie beim Succinimid (Schoch, S. et al, 1974) muß auf der Stufe des PCB nicht zwingend auftreten. (vgl. dazu die bei PCB mögliche Addition von HCl, die im Gegensatz zu den Ergebnissen bei den Succinimiden steht; Klein G., 1977)

2.1. Addition von Ethylmerkaptan an PCBdme

2.1.1. Darstellung der PCBdme-Thioether

PCBdme wurde in ammoniakalkalischem Methanol gelöst (605 nm/

365 nm) und tropfenweise mit Ethylmerkaptan versetzt. Dabei schlägt die anfangs blaue Farbe über die Mischfarbe grün nach gelb um. (vgl. Punkt 2.1.4.). Nach 2.25 Stunden extrahierte man die durch Addition des Thiols an die mittlere Methinbrücke gebildeten rubinoiden Pigmente (vgl. Punkt. 2.1.4.) in Chloroform und blies die neutralgewaschene Probe mit Stickstoff trocken. Durch diesen Schritt wird nicht chemisch gebundenes Ethylmerkaptan von den Pigmenten abgetrennt; es hatte sich gezeigt, daß nicht umgesetztes Ethylmerkaptan aufgrund seiner geringen H_2O -Löslichkeit durch Waschen mit Wasser nicht quantitativ entfernt wird und wieder an die mittlere Methinbrücke anlagert. Der Rückstand ist gelb-grüngefärbt, was auf ein gleichzeitiges Vorliegen von verdinoidem und rubinoidem Pigment zurückzuführen ist. Durch Aufnahme des Rückstandes in saurem Methanol¹ wurde der verdinoide Gallenfarbstoff vollständig freigesetzt; das bei diesem Schritt gleichzeitig entstehende Ethylmerkaptan konnte nach Extraktion der verdinoiden Pigmente in Chloroform nach dem Neutralwaschen durch erneutes Trockenblasen mit Stickstoff vollständig abgetrennt werden. Die Reaktionsmischung absorbierte in ammoniakalischem Methanol bei 580 nm, also in Bezug auf das eingesetzte PCBDme um ca. 25 nm hypsochrom verschoben. In saurem Methanol wies das Absorptionsspektrum Maxima bei 344 nm und 600-628 nm auf. Die für das PCBDme typische Absorption bei 688 nm/380 nm war völlig verschwunden.

Als Nullprobe wurde PCBDme in ammoniakalischem Methanol ohne Zusatz von Ethylmerkaptan 2.25 h inkubiert. Eine Veränderung des Absorptionsspektrums nach gleichartiger Aufarbeitung trat nicht auf. Man untersuchte außerdem, ob eine Additionsreaktion auch durch Aktivierung von PCBDme mit Hilfe von Säure² möglich wäre. Dazu löste man PCBDme in TFA-saurem Methanol (1ml 25% TFA + 20 ml Methanol) und inkubierte wie oben 2.25 h mit Ethylmerkaptan. Während der Inkubation blieb jedoch das Spektrum unverändert.

¹ die rubinoiden Addukte sind in saurem Milieu nicht stabil (Manitto und Monti, 1979)

² Manitto und Monti beschreiben 1973 die säurekatalysierte Addition von Thiolen und Alkoholen an die Vinylfunktion von Bilirubin über ein sogenanntes Isovinyl-Kation (Isovinyl = Ethylenfunktion mit gleichzeitiger Verschiebung der endocyclischen Doppelbindung zwischen C17-C18 zu C16-C17).

2.1.2. Chromatographie und Absorptionsspektroskopie der gereinigten Biline

Aus dem Ansatz in ammoniakalischem Methanol ließen sich zwei blau gefärbte Hauptprodukte von geringfügigen rot und gelb gefärbten Nebenprodukten abtrennen (Abb. 35). Kleine Mengen von nicht umgesetztem PCBdme (hRF 42 in A bzw. 64 in TE) waren ebenfalls nachweisbar. Bei den Ansätzen mit ammoniakalischem Methanol ohne Ethylmerkaptan bzw. TFA-saurem Methanol mit Ethylmerkaptan waren keine Reaktionprodukte nachzuweisen (Abb. 35). Die aus PCBdme und Ethylmerkaptan unter Basenkatalyse (1.2% NH_3)

Abb. 35

Teil A: Chromatographie in Fließmittel A

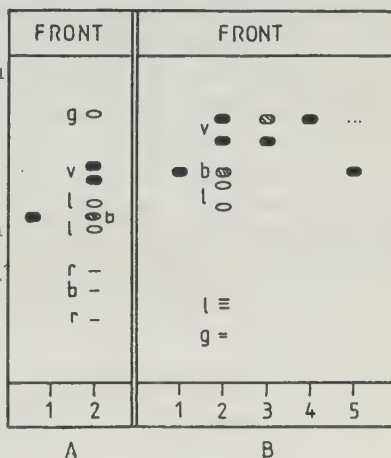
1 = PCBdme 2 = Reaktionsprodukte PCBdme + Ethanthiol in ammoniakalischem Methanol

Teil B: Chromatographie in Fließmittel TEE

1,2 wie Teil A 3, 4 analytische DC nach präparativer Reinigung der α -Ethylchromophore; 3 untere Bande, 4 obere Bande 5 PCBdme + Ethanthiol in TFA/Methanol

Während unter Basenkatalyse in sehr guter Ausbeute zwei violettblaue (v) Chromophore aus dem blauen (b) PCBdme gebildet werden, addiert Ethanthiol unter sauren Bedingungen nicht nachweisbar.

g = gelb, r = rot, l = lila, b = blau, v = violettblau



entstandenen Biline wiesen hRF-Werte von 69 bzw. 67 in Fließmittel A und 79 und 74 in Fließmittel TE auf. (Abb. 35). Die Biline wurden im Fließmittel TE präparativ aufgereinigt; die Bande mit hRF 79 erwies sich schon nach einer Chromatographie bei der nachgeschalteten analytischen DC als rein, während die Bande mit hRF 74 bis zu 40% mit dem höher chromatographierenden Bilin hRF 79 verunreinigt war (Abb. 35) und rechromatographiert werden mußte.

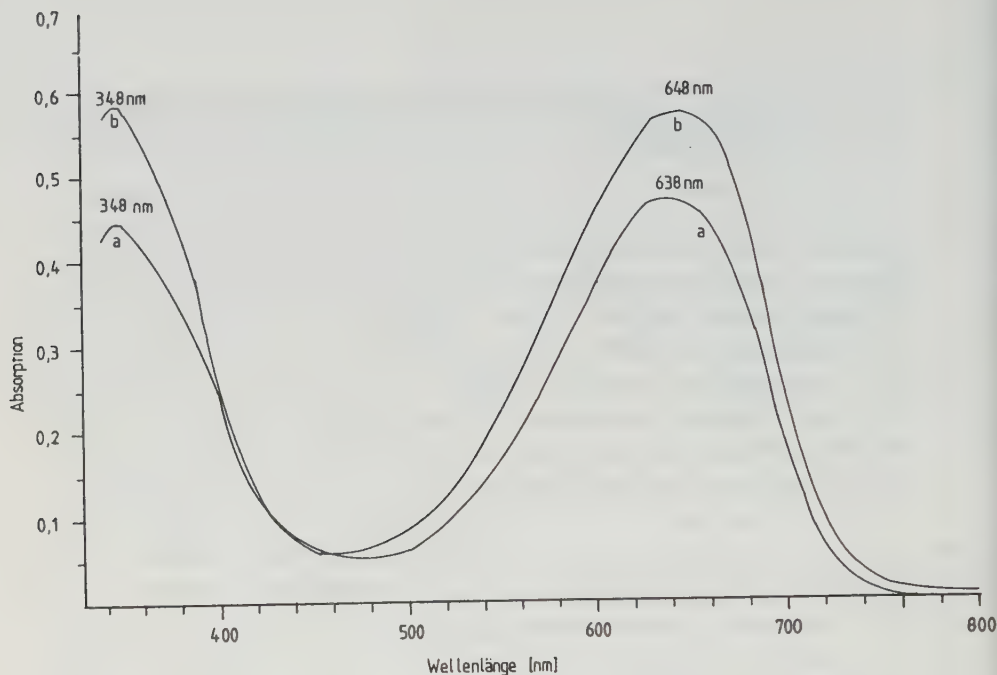


Abb. 36

Während R-konfiguriert (Kurve b) und S-konfiguriert (Kurve a) bei 348 nm absorbiert (Methanol/ H_2SO_4), ist die Lage des Maximum im VIS-Bereich sowie der Quotient VIS/UV unterschiedlich: Für den S-konfigurierten Chromophor errechnet sich ein Quotient von 0,92 (638 nm/348 nm), für den R-konfigurierten ein Wert von 1,03 (648 nm/348 nm)

Die in der DC in TE homogenen Pigmente wiesen in saurem Methanol ein dem α -Chlor-PCBdme sehr ähnliches Spektrum auf: Das Pigment mit hRF 79 absorbiert bei 348 nm/638 nm, das Pigment mit hRF 74 bei 348 nm/648 nm. (Abb. 36). Die relativ zur Absorption des PCBdme hypsochrome Verschiebung des roten Maximums legt eine Addition nahe. Unter Basenkatalyse addiert Ethylmerkaptan sowohl an die exocyclische Doppelbindung von Succinimiden (Schoch, S. et al. 1974 und 1978; Klein, G. und Rüdiger, W. 1978) als auch an die endocyclische Doppelbindung des Maleinimides (Schoch et al., 1974). Auf der Stufe des Tetrapyrrols wäre sowohl eine Addition an Ring A als auch an Ring D denkbar; eine 'zweifache' Addition erscheint jedoch aufgrund des Spektrums unwahrscheinlich.

2.1.3. Beweis der Thioladdition

2.1.3.1. Ausschluß einer Methanoladdition

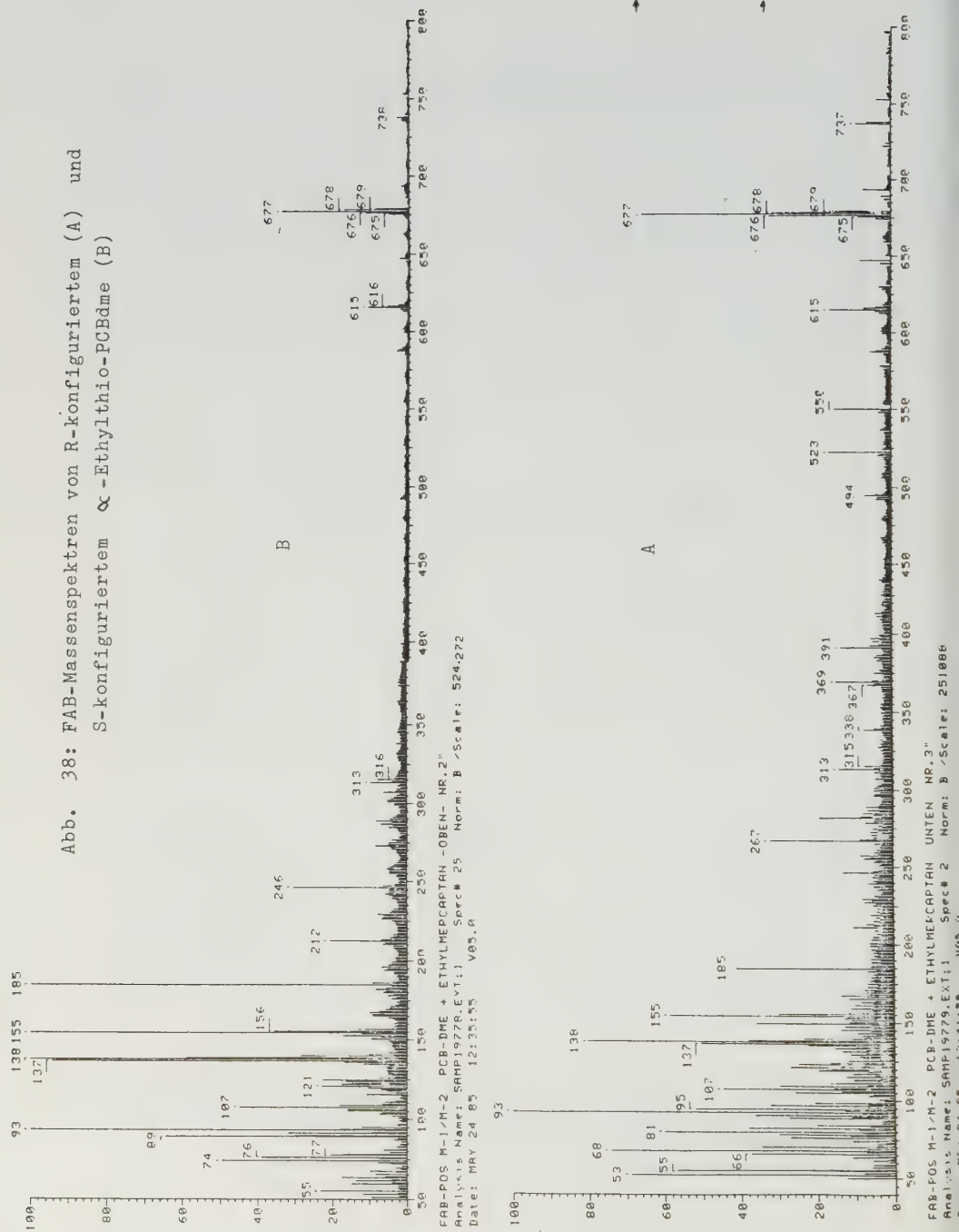
Im Reaktionsgemisch liegt neben dem ionisierten Ethylmerkaptan auch Methanol vor; unter den gewählten milden Reaktionsbedingungen addiert Methanol nicht an Succinimide (Schoch et al., 1974). Auch auf der Stufe des Chromophors erwies sich das Doppelbindungssystem des Chromophors als völlig inert gegenüber Methanol: nach Inkubation in ammoniakalischem Methanol wurde der eingesetzte PCBdme nahezu quantitativ zurückgewonnen. Weder spektral noch dünnschichtchromatographisch (Abb. 35) ließen sich Additionsprodukte nachweisen; auch eine reversible Addition an die mittlere Doppelbindung zwischen den Ringen B und C unterblieb.

2.1.3.2. Beweis der Addition von Ethylmerkaptan durch Massenspektroskopie der Pigmente mit hRF 79 und 74

Als endgültigen Beweis für die Addition von Ethylmerkaptan bot sich ein FAB-Massenspektrum an, da sich sowohl das eingesetzte PCBdme als auch die beiden möglichen Additionsprodukte α -Methoxy-PCBdme und α -Ethylthio-PCBdme in ihren erwarteten Massewerten von $m/e = 614$ (PCBdme), $m/e = 647$ (α -Methoxy-PCBdme) und $m/e = 677$ (Ethylthio-PCBdme) eindeutig unterscheiden.¹ Beide Pigmente mit hRF 79 und 74 weisen im FAB-Spektrum einen intensiven Massenpeak bei 677 mit Nebenpeaks bei 674, 676, 678 und 679 Masseneinheiten auf. Der Peak bei $m/e = 677$ entspricht der erwarteten Masse eines Ethylthio-PCBdme; die Nebenpeaks dürften durch Protonenabstraktion bzw. -addition zustande kommen. Der Peak bei 615 Masseneinheiten läßt sich auf das Eliminationsprodukt PCBdme (+ 1) zurückführen. Das Pigment mit hRF 74 (Abb. 38 A) weist einen ca. doppelt so großen Massenpeak auf, wie das Pigment mit hRF 79 (Abb. 38 B). Ebenso ist der Bereich zwischen $m/e = 320$

¹ Eine Methanoladdition konnte zwar ausgeschlossen werden, jedoch bestand noch die Möglichkeit, daß ein einmal gebildetes Ethylthio-Bilin durch Methanol substituiert würde

Abb. 38: FAB-Massenspektren von R-konfiguriertem (A) und S-konfiguriertem α -Ethylthio-PCBdme (B)



und $m/e = 615$ unterschiedlich: während bei dem Bilin hRF 79 in diesem Bereich keine intensiven Peaks auftreten, finden sich bei dem Gallenfarbstoff hRF 74 Peaks vor allem bei $m/e = 369$, 391, 494, 523 und 550. Ein Unterschied im Fragmentationsmuster wurde von Klein 1977 auf der Stufe der diastereomeren Sulfonylsuccinimide gefunden: hier zeigte auch das langsamer wandernde, R-konfigurierte Diastereomer ein komplexeres Fragmentationsmuster.

Durch den Massenpeak bei $m/e = 677$ war zweifelsfrei erwiesen, daß beide Pigmente Additionsprodukte des Ethylmerkaptans darstellen. Die Frage nach der Stellung der Substituenten sollte mittels Chromsäureabbau geklärt werden.

2.1.3.3. Nachweis einer regioselektiven Thioladdition an Ring A

Je nach Additionsort des Ethylmerkaptans müssen nach dem Chromsäureabbau unterschiedliche Imidmuster auftreten: bei der Addition an Ring D wird bei gleichzeitigem Fehlen von MEM ein angular substituiertes Ethylsulfonyl-Succinimid¹ auftreten; bei einer Addition an Ring A werden bei gleichzeitigem Fehlen von Ethyliden-Succinimiden angular oder/und in α -Stellung substituierte Ethylsulfonyl-Succinimide¹ erwartet. Authentische, in α -Stellung substituierte Succinimide sind durch Addition von Ethylmerkaptan an Ethylidensuccinimid mit anschließender Inkubation in Chromsäure zugänglich (Klein, G. 1977).

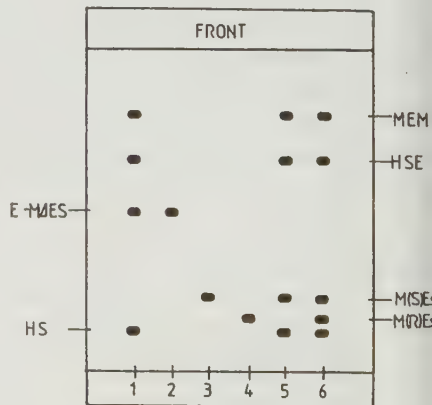
Die beiden Pigmente mit hRF 79 bzw. 74 wurden mit Chromsäure abgebaut und die in Essigester extrahierten Imide im Vergleich mit authentischen Sulfonylsuccinimiden (Klein, G. 1977) im Fließmittel TEC 2 chromatographiert (Abb. 37). Man erhält aus dem Pig-

¹ Unter den Bedingungen des Chromsäureabbaus werden die Thioether zu den Sulfonen oxidiert (Klein, G. 1977)

ment mit hRF 79 neben MEM und HSE anstelle von Ethylidensuccinimid ein Imid mit hRF 24, das mit β^* -konfiguriertem Sulfonyl-Succinimid cochromatographiert. Aus dem Pigment mit hRF 74 sind neben MEM und HSE zwei Imide zu finden, die wie α^* und β^* -konfiguriertes Ethylsulfonylsuccinimid wandern. Die Konzentration des Imides mit hRF 16, das mit α^* -konfiguriertem Ethylsulfonylsuccinimid chromatographiert, ist dabei etwa doppelt so groß. Zusätzlich zu den eben erwähnten Imiden fand man manchmal ein Imid mit hRF 78, das zwischen HSE (hRF 72) und MEM (hRF 84) wandert. Da dieses Imid mit verlängerter Inkubation in Chromsäure immer stärker abnimmt, stellt es wohl den noch nicht zum Sulfon oxidierten Thioether dar. Die Tatsache, daß aus dem in der DC einheitlichen Bilin mit hRF 74 beide diastereomere Succinimide entstehen, kann durch eine Konfigurationsumkehr unter sauren Bedingungen erklärt werden. Eine derartige Konfigurationsumkehr, $\alpha^* \rightarrow \beta^*$, wurde auf der Stufe der Succinimide zwar nur mit heißer Chromsäure festgestellt (Klein, G. 1977). Für eine sauer katalysierte Konfigurationsumkehr spricht aber die Tatsache, daß sich das Verhältnis R-konfigurierter Chromophor : S-konfigurierter Chromophor bei der Veresterung mit H_2SO_4 /Methanol zugunsten des S-konfigurierten Chromophors verschiebt.

Abb. 37

Der Chromsäureabbau von PCBdme liefert MEM, HSE, HS, und E-MDES(1). Während MEM und HSE bei beiden α -Ethylchromophoren (5 obere Bande, 6 untere Bande) entstehen, findet sich bei der unteren Bande (6) statt E-MDES (2) zwei Imide, die wie α^* -konfiguriertes (4) und β^* -konfiguriertes (3) Ethylsulfonylsuccinimid chromatographieren. Aus der oberen Bande entsteht neben MEM, HSE und HS nur ein Imid (5), das wie β^* -konfiguriertes Ethylsulfonylsuccinimid (3) wandert. Fließmittel TEC 2.



Dem schneller wandernden Ethylsulfonylsuccinimid wird am C 2' eine S-Konfiguration, dem langsamer wandernden eine R-Konfiguration zugeordnet (Klein, G. und Rüdiger, W. 1978). Daraus ist zu folgern, daß das Pigment mit hRF 79 am C 3' eine S-Konfiguration das Pigment mit hRF 74 eine R-Konfiguration aufweist (Abb. 39).

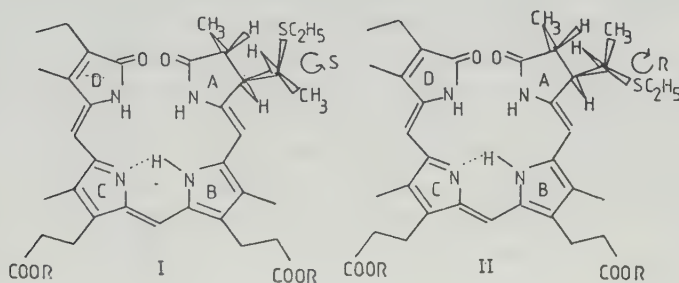


Abb. 39

α -Ethylthio-PCBdme (hRF = 79) ist an C 3' S-konfiguriert, während der Chromophor mit hRF = 74 an C 3' R-konfiguriert ist.

Die Hauptprodukte der Reaktion von PCBdme und Ethylmerkaptan in ammoniakalischem Methanol sind also die diastereomeren α -Ethylthio-PCBdme. Die beiden Chromophore stehen in einem Verhältnis von ca. 2-3 : 1 für R-konfiguriert : S-konfiguriert. Klein und Rüdiger beschrieben 1979 bei der längeren Inkubation von PCBdme in Ethylmercaptan ein Übergewicht des S-konfigurierten Bilins und diskutieren sowohl eine sterische Hinderung als auch einen kinetischen Effekt bei reversibler Addition. Aufgrund des bei der basenkatalytischen Addition auftretenden Übergewichtes der R-konfigurierten Form ist ein kinetischer Effekt wahrscheinlicher.

2.1.4. Diskussion der Additions geschwindigkeit anhand des Spektrums des rubinoiden Zwischenproduktes

Wie erwähnt schlägt bei dem Zusatz von Ethylmerkaptan zu in NH_3 /Methanol gelöstem PCBdme (605 nm/365 nm) die Farbe über grün nach gelb um. Die Reaktionsmischung weist Maxima bei 410 nm (Hauptpeak), 348 nm und 590nm - 640 nm auf (Abb. 40).

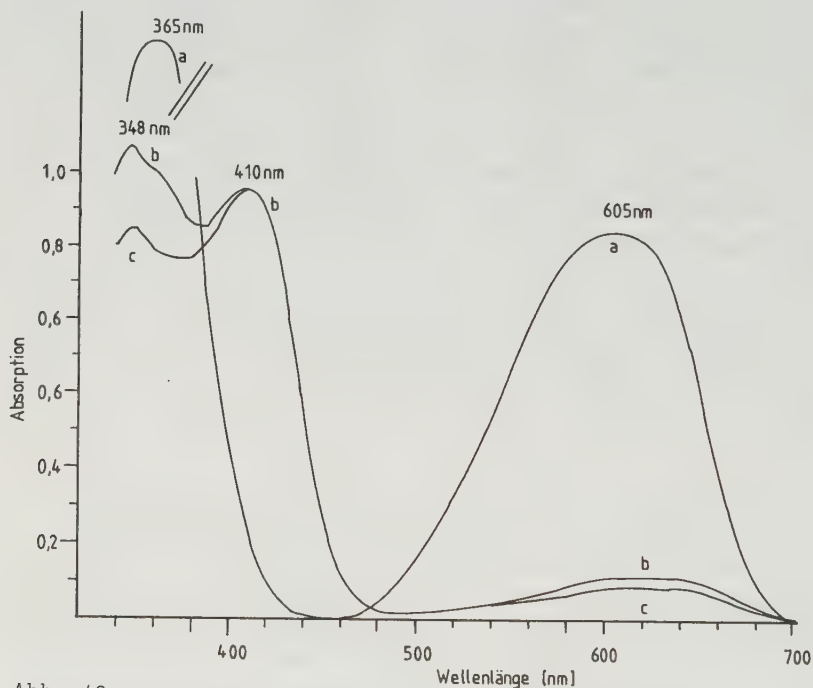


Abb. 40

Nach Zusatz von Ethanthiol zu PCBdme in ammoniakalischem Methanol (Kurve a), bleicht die Bande bei 605 nm sofort aus, die kurzwellige Absorption ist von 365 nm auf 348 nm verschoben, während ein zusätzlicher Peak bei 410 nm erscheint (Kurve b; 10' nach Zusatz des Thiols). Nach 2 h Reaktionsdauer bleibt die Extinktion bei 410 nm gleich, ist jedoch im VIS-Bereich und bei 348 nm verringert (Kurve c). Für die nach 10' bzw. 120' vorliegende Chromophorspezies vgl. Abb. 41.

Durch reversible Addition von Nukleophilen an die mittlere Methinbrücke¹ entstehen rubinoide Biline (Kufer, 1980; Scheer, 1981; Beltrame et al, 1985) mit unterbrochenem π -Elektronensystem. Die Absorption des Reaktionsgemisches (PCBdme + Ethylmerkaptan) ist mit 410 nm identisch mit dem Absorptionsmaxima des Thioladduktes von Dihydrooktaethylbiliverdin (=DHOEBV; Kufer, 1980 vgl. Abb. 41). DHOEBV² besitzt die gleiche Anzahl an konjugierten Doppelbindungen wie α -Ethylthio-PCBdme, während Oktaethylbiliverdin (OEBV) 2 konjugierte Doppelbindungen mehr besitzt wie α -substituiertes PCBdme. Das Addukt von OEBV absorbiert bei 426 nm (Kufer, 1980). Für das Addukt von PCBdme wird daher eine Absorption erwartet, die zwischen den Absorptionsmaxima der C10-Addukte von DHOEBV (410 nm) und OEBV (426 nm) liegt. Die Übereinstimmung des Absorptionsmaximums der Reaktionsmischung PCBdme + Ethylmerkaptan mit dem Absorptionsmaximum des DHOEBV-Adduktes weist darauf hin, daß das Ethylmerkaptan sehr schnell an die Doppelbindung des PCBdme addiert hat und im Reaktionsgemisch überwiegend das Addukt a (Abb. 41) vorliegt. Eine schnelle Addition wird auch dadurch belegt, daß sich das Spektrum der Reaktionsmischung im Verlauf der Reaktion ($t = 2,25h$) nur sehr wenig ändert: Die Absorption des Thioladduktes ist zusammengesetzt aus der Absorption beider Chromophorhälften (Vinylpyrrol und Oxopyrromethen² in Addukt a, Abb. 41, bzw. Oxopyrromethen und Pentadienpyrrol in Addukt b der Abb. 2). Addiert nun ein Thiol

¹ Die Elektronendichte ist am C 10 besonders niedrig, so daß hier bevorzugt Nukleophile addieren (Scheer, H. et al. 1982)

² OEBV und DHOEBV besitzen jeweils 8 Ethylgruppen als β -ständige Substituenten. Während der Ring A von OEBV eine Doppelbindung aufweist, ist er bei DHOEBV hydriert. Das OEBV-Addukt ist aus zwei identischen Oxopyrromethenen zusammengesetzt. DHOEBV-Addukt ist wie das PCBdme-Addukt mit Substitution in α -Stellung (a in Abb. 36) aus einer Vinylpyrrol-Struktur, Ringe A und B, und einem Oxopyrromethen-Chromophor (Ringe C und D) zusammengesetzt. Vinylpyrrole absorbieren bei 274 nm - 386 nm (Gossauer, A. 1974), Oxopyrromethene bei ca. 410 nm - 418 nm (Kufer, 1980).

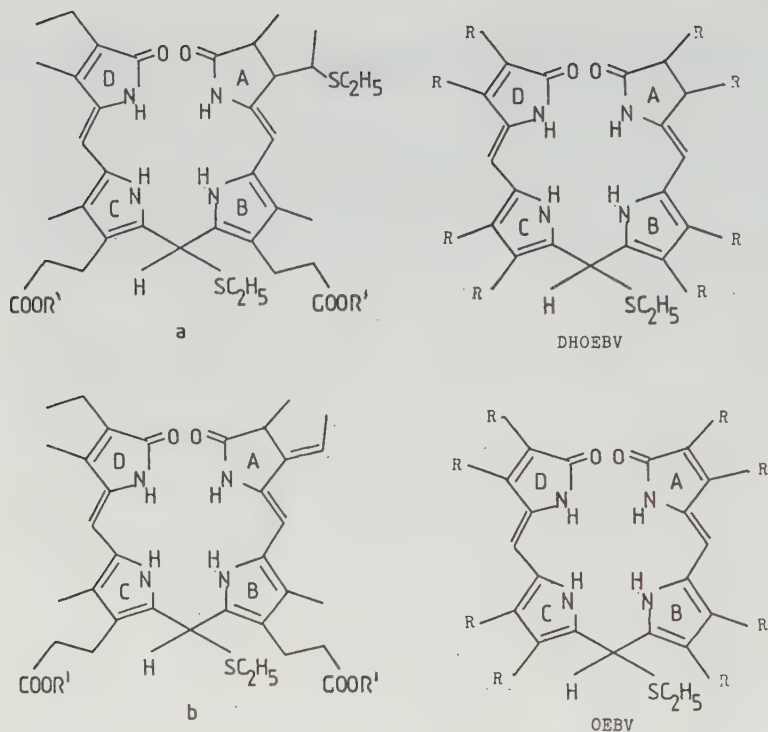


Abb. 41: Die Addukte von DHOEBV und α -Ethylthio-PCBdme a besitzen in beiden Chromophorhlfen die gleiche Anzahl an konjugierten Doppelbindungen. Das Addukt von PCBdme (b) besitzt 1 konjugierte Doppelbindung mehr wie das Addukt von DHOEBV und eine Doppelbindung weniger wie OEBV.
 $\text{R}' = \text{CH}_3$ $\text{R} = \text{C}_2\text{H}_5$

an die Ethylidengruppe des Adduktes b (Abb.41), so muß sich mit der hypsochromen Absorptionsverschiebung der Ringe A, B bei gleichbleibender Absorption der Ringe C, D das zusammengesetzte Maximum zu niedrigen Wellenlängen verschieben. Das Maximum bei 410 nm bleibt aber während der Inkubation ($t = 2,25$ h) konstant, d.h. daß das Thiol nicht langsam addiert, sondern schon kurz nach der Zugabe von Ethylmercaptan das Addukt a (Abb. 41) vorliegt, also die Addition an die Ethylidengruppe bereits stattgefunden hat. Diese sehr schnelle Reaktion unter Basenkatalyse ist in Bezug auf die Synthese von Biliproteinen in vivo von Bedeutung.

2.2. Addition von Merkaptoethanol

2.2.1. Darstellung von Hydroxyethyl-Thio-PCBdme

Im Hinblick auf die Biosynthese der Biliproteine sollte nun untersucht werde, ob PCBdme auch in wässrigem Milieu unter sonst gleichen Bedingungen Thiole addiert. Da Ethylmerkaptan¹ sich nicht mit Wasser mischt, wurde diese Addition mit dem sowohl in Wasser als auch in Methanol löslichem Merkaptoethanol untersucht. Die Thioladdition in Wasser konnte also mit der Addition in Methanol verglichen werden. PCBdme wurde in wässrigem² bzw. methanolischem Ammoniak (1 ml 25% NH_3 auf 20 ml Wasser bzw. Methanol) gelöst und solange mit Merkaptoethanol tropfenweise versetzt, bis die ursprünglich blaue Lösung gelb gefärbt war. Nach 2.25 Stunden wurden die Ansätze wie unter Punkt 2.1.1. beschrieben, aufgearbeitet, mit dem Unterschied, daß die wässrige Probe mit methanolischem Chloroform (1:2, v:v) extrahiert wurde.

2.2.2. Chromatographische Eigenschaften der Additionsprodukte

Da bei der geringen Ammoniakkonzentration keine Esterspaltung stattfand, konnten sowohl die Reaktionsprodukte des wässrigen als auch des methanolischen Ansatzes ohne "Nachveresterung" in der DC untersucht werden. Wie Abb. 42 zeigt, erhält man im System TEH^+ aus dem wässrigen und dem methanolischen Ansatz zwei blaue chromatographisch identische Pigmente (hRF 35 bzw. 32), die sich von dem eingesetzten PCBdme (hRF 76) deutlich abtrennen.

¹ Die Reaktion PCBdme + Ethylmerkaptan findet zwar mit Wasser als primärem Lösungsmittel statt, jedoch extrahieren die Pigmente sofort nach Zusatz von Ethylmerkaptan in letzteres (obere Phase); die hier stattfindende Additionsreaktion dürfte analog zu der von Klein und Rüdiger 1979 beschriebenen Addition in reinem Ethylmerkaptan verlaufen.

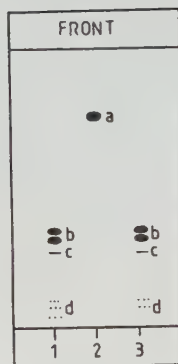
² Da sich PCBdme nur schlecht in wässrigem NH_3 löst, wurde es in in 50 μl Methanol angelöst, dann mit 1 ml wässrigem NH_3 versetzt.

Abb. 42

Chromatographie in Fließmittel TEE

- 1 Merkaptoethanol + PCBdme in wäßrigem Ammoniak
- 2 PCBdme
- 3 Merkaptoethanol + PCBdme in methanolischem Ammoniak

Die Chromatographie der Reaktionsprodukte von Merkaptoethanol und PCBdme zeigt sowohl für den wäßrigen wie für den methanolischen Ansatz das gleiche Bild: neben Spuren von roten (d) und blauen (c) Chromophoren entstehen zwei violettblaue Biline b.



2.2.3. Spektrale Eigenschaften der Additionsprodukte

Aufgrund der geringen Unterschiede ihrer Wanderungsgeschwindigkeiten gelang es nicht, die beiden blauen Pigmente mit hRF 35 bzw. 32 in präparativem Maßstab voneinander zu trennen. In saurem Methanol wies das Pigmentgemisch (hRF 32 - 35) Maxima bei 348 nm und 644 nm auf. Beide Maxima sind gegenüber der Absorption des PCBdme (688 nm und 378 nm) hypsochrom verschoben (Abb. 43), d.h., daß in den neuen, sehr polaren Pigmenten das Konjugationssystem verkürzt ist. In Analogie zu den bereits charakterisierten α -Ethylthio-PCBdme (Absorption: R-konfiguriert 648 nm, S-konfiguriert 638 nm im langwelligen Bereich) ist anzunehmen, daß auch bei der Reaktion von PCBdme mit Merkaptoethanol eine Addition an die exocyclische Doppelbindung stattgefunden hat.

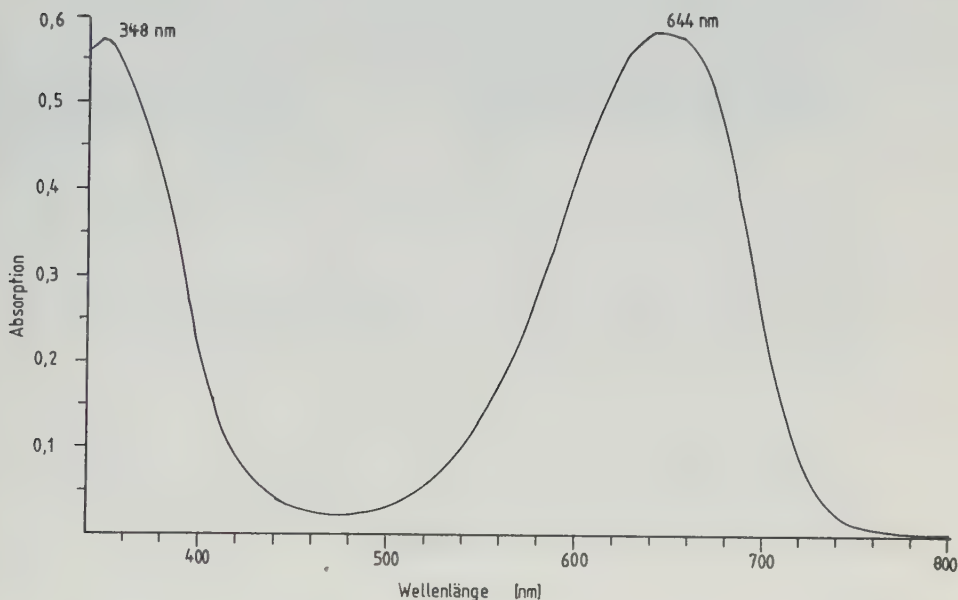


Abb. 43

α -Hydroxyethylthio-PCBdme(Merkaptoethanol-PCBdme) absorbiert bei 348 nm im nahen UV und bei 644 nm im sichtbaren Bereich. Der UV/VIS-Quotient beträgt 0,97 (Lösungsmittel: Methanol/H₂SO₄)

2.2.4. Chromsäureabbau der Additionsprodukte

Nach einer Addition von Merkaptoethanol an die exocyclische Doppelbindung des PCBdme muß der Chromsäureabbau der Pigmente neben MEM, HSE bzw. HS ein neues Succinimid liefern. Dieses Succinimid sollte, bedingt durch seinen polaren Substituenten -SO₂C₂H₄-OH noch polarer sein als die aus den α -Ethylthio-PCBdme entstehenden, durch Chromsäure zum Sulfon oxidierten

Ethyl-Sulfonyl-Succinimide (Abb. 44).

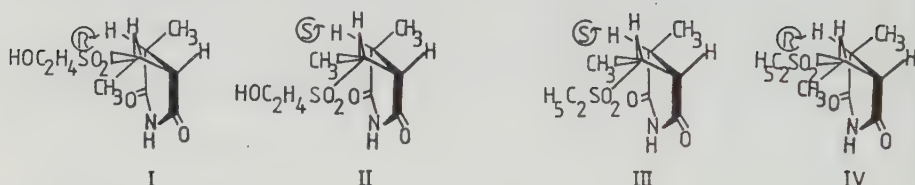


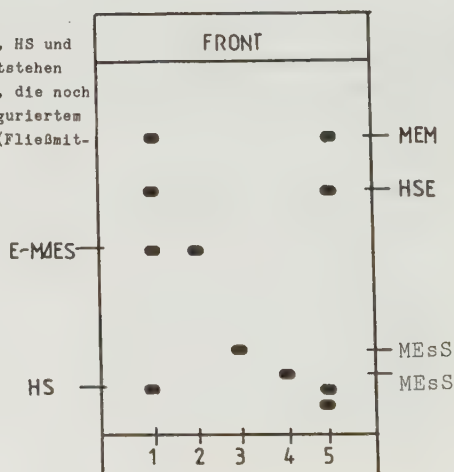
Abb. 44

Der Chromsäureabbau von α -Ethylthio-PCBdme liefert statt M α ES, je nach der Konfiguration des Bilins am des Bilins am C 3' S- (III) bzw. R-konfiguriertes Sulfonylsuccinimid (IV) (der Thioether wird unter den angewendeten Bedingungen zum Sulfon oxidiert). Das Additionsprodukt "Mercaptoethanol plus PCBdme" sollte die durch die Hydroxy-Gruppe noch polaren Hydroxyethylsulfonylsuccinimide I und II liefern.

Bei der dünnschichtchromatographischen Analyse im System TEC 2 der aus dem Abbaugemisch mit Essigester extrahierten Imide fand sich neben MEM(hRF = 81) und HSE (hRF = 66) ein Imid mit hRF 9 (Abb. 45). Dieses Imid chromatographiert noch unter den schon

Abb. 45

Der Chromsäureabbau von PCBdme liefert MEM, HSE, HS und E-M α ES (1). Aus den Merkaptioethanol-PCBdme entstehen neben MEM und HSE statt M α ES (2) zwei Imide (5), die noch unterhalb von β^* -konfiguriertem (3) bzw. α^* -konfiguriertem Ethylsulfonylsuccinimid (4) chromatographieren. (Fließmittel TEC 2)



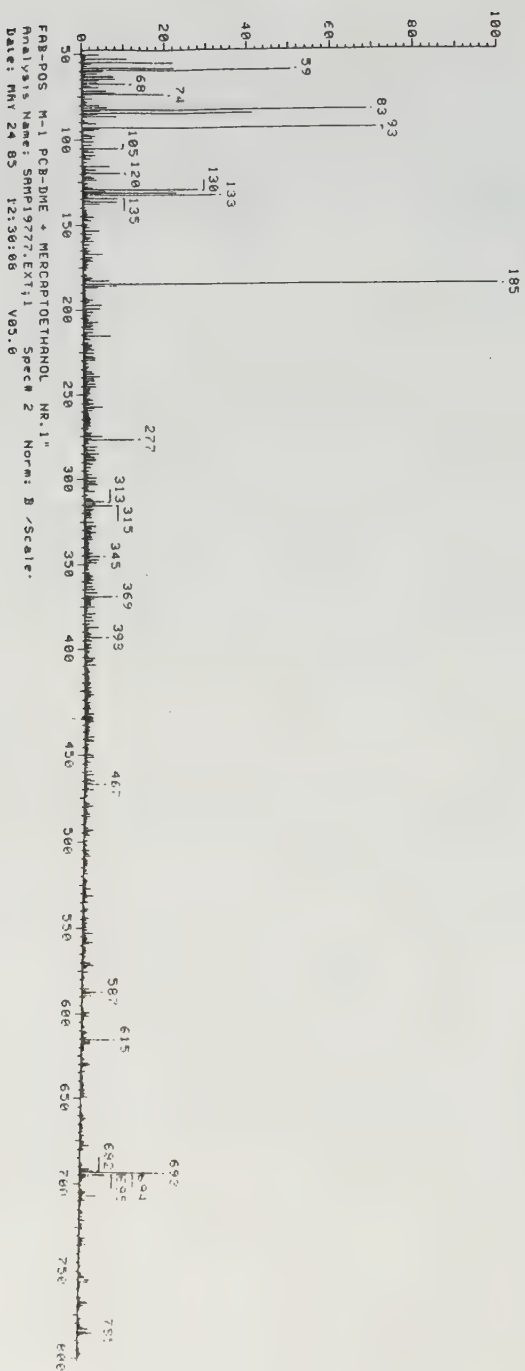
beschriebenen α -Ethylsulfonyl-Succinimiden (hRF 24 β^* -konfiguriert, hRF 16 α^* -konfiguriert). Das Auftreten der Imide MEM, HSE und Imid hRF 9 bei gleichzeitigem Fehlen von M AES (hRF 49) beweist, daß bei der Reaktion von PCBdme mit Merkaptoethanol eine Addition an die exocyclische Doppelbindung stattgefunden hat.

Vergleicht man nun die Nukleophilie der im Reaktionsansatz vorliegenden möglichen Reaktanden: ^-OH bzw. MeO^- aus dem Lösungsmittel bzw. $^-\text{S-C}_2\text{H}_4\text{-OH}$ und $^-\text{S-C}_2\text{H}_4\text{-O}^-$ aus dem zugesetzten Merkaptoethanol, so ist wahrscheinlich, daß nur das Merkaptoethanol über sein Thiolatanion an die Doppelbindung addiert hat. Eine Addition von H_2O ist auszuschließen, da das Imid mit hRF 9 sich deutlich von einem α -Hydroxysuccinimid unterscheidet, das in dem verwendeten Fließmittel immer schneller läuft als Haematinsäure (hRF 12). Eine Addition von Methanol ist sowohl durch die unter Punkt 2.1.3.1. beschriebenen Ergebnisse als auch dadurch unwahrscheinlich, daß PCBdme und Merkaptoethanol unabhängig vom verwendeten Lösungsmittel die gleichen Reaktionsprodukte liefern. Die Addition von Merkaptoethanol via das Thiolatanion ist auch in Analogie zur Addition von Ethalmerkaptan wahrscheinlich.

2.2.5. Massenspektroskopie der Additionsprodukte

Die aufgrund der spektralen bzw. der im Chromsäureabbau erhaltenen Daten wahrscheinlich gemachten Addition von Merkaptoethanol an PCBdme konnte massenspektroskopisch bewiesen werden. (Abb. 46). Für α -Hydroxy-Thio-PCBdme läßt sich eine Masse von 693 berechnen. Die im FAB-Massenspektrum gefundenen Peaks bei $m/e = 692, 693$ (Hauptpeak), 694 und 695 lassen sich mit der berechneten Masse korrelieren. Der zusätzlich auftretende Peak $m/e = 785$ läßt sich durch ein Umesterungsprodukt (der Austausch von O-CH_3 gegen $\text{-O-C}_2\text{H}_4\text{-SH}$ bedingt einen Massenunterschied von $2 \times 46 = 92$) erklären.

Abb. 46: FAB-Massenspektrum des diastereomeren α -Hydroxyethylthio-PCBane



Die Addition von Mercaptoethanol an die exocyclische Doppelbindung des PCBdme ist also durch das hypsochrom verschobene Absorptionsmaximum, das Auftreten des polaren Imides hRF 9 nach Chromsäureabbau und durch den Massenpeak bewiesen.

2.2.6. Schlußfolgerung und Diskussion bezüglich der Biosynthese von Biliproteinen

Für das Reaktionsprodukt PCBdme und Merkaptoethanol in Wasser bzw. Methanol wird aufgrund der experimentellen Daten und in Analogie zur Addition von Ethylmerkaptan in Methanol die in Abb. 47 gezeigt Struktur postuliert:

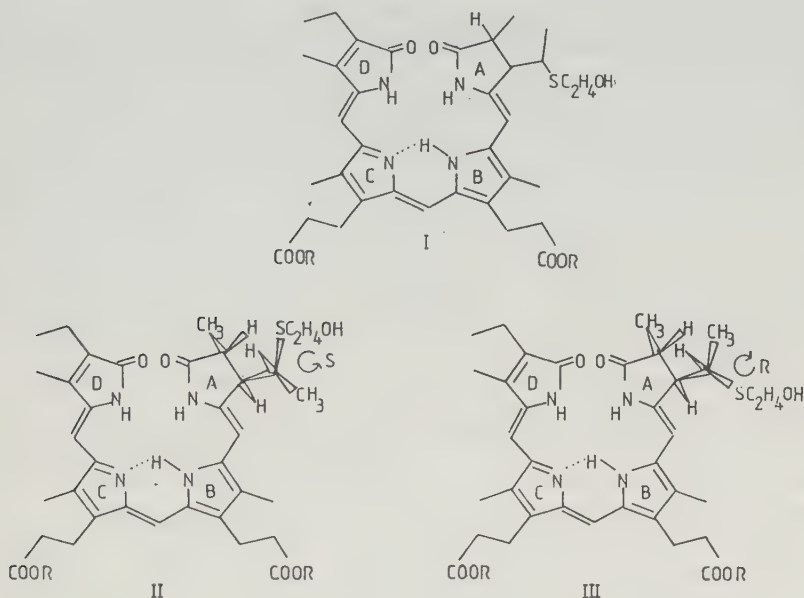


Abb. 47

Für das Additionsprodukt aus PCBdme und Mercaptoethanol wird eine Thioetherbindung postuliert (I). In Analogie zum chromatographischen Verhalten vergleichbarer diastereomerer Biline, ist für das Bilin mit hRF 35 eine S-Konfiguration an dem C 3' (II), für den Gallenfarbstoff mit hRF 32 eine R-Konfiguration (III) wahrscheinlich.

Eine alleinige Addition von Merkaptoethanol über die Sauerstofffunktion ist durch die wesentlich geringere Nukleophilie des Sauerstoffatoms verglichen mit dem Schwefelatom extrem unwahrscheinlich. Wie gezeigt, liefert die Addition von Merkaptoethanol an PCBdme zwei polare Produkte, die sich jedoch im präparativen Maßstab nicht voneinander trennen ließen. In Analogie zur Addition von Ethylmerkaptan ist anzunehmen, daß diese Pigmente die diastereomeren α -Hydroxy-Ethylthio-PCBdme darstellen (Abb. 42). Vergleicht man nun die chromatographischen Daten der α -Ethylthio-PCBdme bzw. der α -Chlor-PCBdme, so chromatographiert immer das S-konfigurierte Diastereomer höher. Deshalb wird für das Pigment mit hRF 35 eine S-Konfiguration, für das Pigment mit hRF 32 eine R-Konfiguration postuliert (Abb. 47).

Die Tatsache, daß auch in wäßrigem Milieu bei RT eine Thioladdition an PCBdme stattfindet, ist für die noch hypothetische Verknüpfung von praesynthetisiertem Apoprotein (Steinmüller et al. 1982; Schuster et al. 1983) mit dem Bilinchromophor bedeutungsvoll. Eine unterschiedliche Reaktivität der exocyclischen Doppelbindung des Ringes A bei veresterten bzw. unveresterten Bilinen ist nicht zu erwarten. Wie in der Einleitung erwähnt, wird in der Literatur sowohl die Verknüpfung des Apoproteins mit dem von *Cyanidium caldarium* (Wildtyp und Mutanten) ausgeschiedenem PCB (Troxler et al, 1978) diskutiert, als auch die Reaktion mit einem A-Dihydrohalbmesobiliverdin (Köst und Benedikt 1978). Die Versuche zur Addition von Thiolen an PCBdme haben nun gezeigt, daß die Doppelbindung des PCB auch in wässrigem Milieu genügend reaktiv ist, um unter Basenkatalyse Thiole zu addieren. Die bei den Additionsreaktionen zur Aktivierung des Thiols eingesetzte Menge an Ammoniak errechnet sich zu 0,27 molar. Der pH-Wert der wässrigen Ammoniak-Lösung wurde zu 10.3 bestimmt. Bei diesem pH-Wert ist auch die Thiofunktion des Cysteins, der ein pK von 8.333 zuzuordnen ist (Lehninger, A. 1979) zu ca. 99% ionisiert. Man könnte sich nun vorstellen,

daß die Thiolgruppe des Apoproteins-Cystein durch Reaktion z.B. mit Arginin (pK 12,42, Lehninger, A. 1979) deprotoniert wird und dann mit dem PCBdme - durch Enzymkatalyse stereospezifisch zum R-konfigurierten - "Chromoprotein" also Phycocyanin reagiert. Jedenfalls erscheint aufgrund der leichten Addition von Thiolen an PCBdme in wässrigem Milieu auch ein enzymatische Addition von Apoprotein-Cystein⁻ an PCB möglich. ¹

E- bzw. Z-PCB wird jedoch nicht den direkten Vorläufer für über den Ring D gebundenen Chromophor darstellen. Hier wäre eine Addition auf der Stufe von Biliverdin denkbar: das über den Ring D gebundene C18-Biliverdin könnte dann weiter reduziert werden.

2.3. Spaltung der diastereomeren α -Ethylthio-PCBdme mit HCl

Im Hinblick auf die atypisch leichte Abspaltung der Bilinchromophore mit HCl, wurde nun untersucht, ob Salzsäure den sehr viel einfacher gebauten α -Ethylthio-PCBdme in gleicher Weise spaltet. Während im Phycocyanin beide Reste des Sulfids in β -Stellung funktionelle Gruppen besitzen (Doppelbindung im Bilin, Carbonamid im Proteinanteil), besitzt das Chromophor-Ethyl-Sulfid nur im Bilinanteil eine Doppelbindung. Eventuelle, aktivierende Nachbargruppeneffekte des Proteinanteils fallen hier also fort.

2.3.1. Spektrale und dünnschichtchromatographische Analyse des Abspaltungsgemisches

R- bzw. S-konfiguriertes α -Ethylthio-PCBdme (Ansatz 1 bzw. 2) wurde im Vergleich mit Phycocyanin (Ansatz 3) in Salzsäure inkubiert und die abgespaltenen Biline extrahiert und verestert. Die in saurem Methanol aufgenommenen Spektren unterscheiden sich nur geringfügig: die Reaktionprodukte aus dem R-konfigurierten α -Ethylthio-PCBdme sowie die Produkte aus Phycocyanin absorbieren bei 655nm/358 nm, die Reaktionsprodukte aus dem S-konfigurierten α -Ethyl-PCBdme bei 655 nm/360 nm; d.h. die Absorptionsmaxima der Produkte sind bezogen auf die Absorption der eingesetzten α -Ethylthio-PCBdme bathochrom verschoben (E in saurem Methanol 648 nm = R-konfiguriert; 638 nm = S-konfiguriert).

Die dünnschichtchromatographische Analyse der 3 Ansätze zeigte ein einheitliches Bild¹ neben einer Bande mit hRF 72 war eine Bande mit hRF 64 zu finden (Fließmittel: TE). Der Bilindme mit hRF 64 kann nun entweder R-Chlor-PCBdme oder E-PCBdme darstellen (vgl. 1.9.3.2); unabhängig davon zeigt das Auftreten dieser Bande, daß sowohl der R- als auch der S-konfigurierte α -Ethylthio-PCBdme mit HCl reagiert hat und zwar entweder durch Eliminierung zu E-PCBdme oder durch Substitution bzw. Elimination/Addition zu R-Chlor-PCBdme (vgl. 1.8.). Die Identität der Bande mit hRF 72 war aufgrund der geringen Unterschiede im hRF-Wert der beiden S-konfigurierten Biline, S-Ethylthio-PCBdme und S-Chlor-PCBdme nicht festzustellen.en.

2.3.2. Chromsäureabbau der Abspaltungsgemische

Nach dem Chromsäureabbau konnten bei allen drei Ansätzen neben MEM, HSE bzw. HS, α^* und β^* -konfiguriertes Chlorsuccinimid eindeutig nachgewiesen werden. E-MAES fehlte dagegen wie Z-MAES vollständig. Das beweist, daß, wie auch bei der Abspaltung des Bilinchromophors aus Phycocyanin, beide diastereomere α -Ethylthio-PCBdme mit HCl zu R- und S-konfiguriertem Chlor-PCBdme reagieren. Die atypisch leichte Spaltbarkeit der Bilin-Protein-Thioetherbindung ist daher nicht auf Nachbargruppeneffekte des Proteins zurückzuführen, sondern dürfte durch die β -ständige Doppelbindung bedingt sein.

Die aus den beiden diastereomeren α -Ethylthio-PCBdme durch HCl abgespaltenen S- und R-konfigurierten Chlor-PCBdme unterscheiden sich in ihrem Mengenverhältnis nur geringfügig: aus dem S-konfigurierten Edukt entsteht etwas mehr S-konfiguriertes Produkt als aus R-Ethylthio-PCBdme bzw. Phycocyanin. Da aber sowohl die Substitution nach einem SN_1 -Mechanismus als auch eine Addition bei einem Eliminations/Additions-Mechanismus über ein Carboniumion als Übergangszustand verläuft, lassen sich aus den bisher gesammelten Daten keine Rückschlüsse auf den Reaktionsmechanismus ziehen.

¹ Unter den Reaktionsprodukten des Ansatzes mit R-Ethylthio-PCBdme fand sich eine sehr schwache Bande ungeklärter Zusammensetzung

3. Isoelektrische Fokussierung von Gallenfarbstoffen

Die Reinigung von Bilinen erfolgt meist nach Veresterung der Carboxylgruppen durch DC auf Kieselgel (vgl. Rüdiger, 1971). Durch die Maskierung der sauren Carboxylgruppen, die bei physiologischem pH größtenteils ionisiert vorliegt, sind jedoch die Bilindme für manche Experimente, z.B. Fütterungsversuche nicht brauchbar. Eine Esterhydrolyse führt aber meist zu Umlagerungen. Da die freien Gallenfarbstoffsäuren aufgrund der beiden Propionsäureseitenketten und des Pyrrolenin-Stickstoffes amphoter sind (vgl. Abb. 49), sollten sie durch Isoelektrische Fokussierung gereinigt werden können. Elektrophoretische Trennverfahren wurden zur Untersuchung von "pathologischen" Porphyrinen (Clotten, 1971) und der Serumalbumin-Bilirubin-Bindung angewendet (With, 1985). nicht jedoch die Isoelektrische Fokussierung.

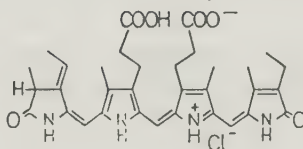
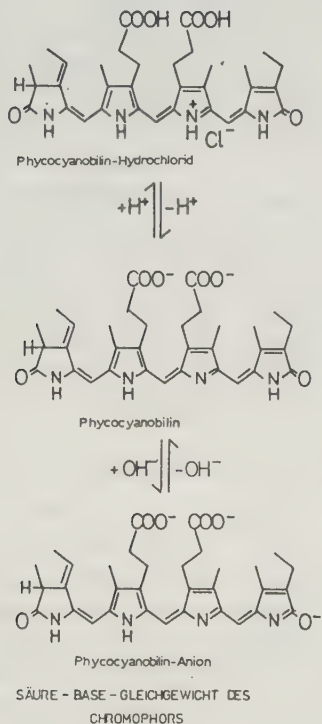


Abb. 49

Am isoelektrischen Punkt vorliegendes Phycocyanobilin-Hydrochlorid; das Molekül mit protoniertem, positiven Stickstoff und ionisierter Propionsäureseitenkette (gleichberechtigt an Ring B bzw. C) besitzt die Nettoladung Null und wandert im elektrischen Feld nicht mehr.

3.1. Ergebnisse der Isoelektrischen Fokussierung

3.1.1. Isoelektrische Punkte und Spektraldaten der fokussierten Biline: Vorschläge für ihre Struktur

Für die Isoelektrische Fokussierung wurden die mit HCl oder Methanol von Phycocyanin (PC) bzw. Phycoerythrin (PE) abgespaltenen Biline eingesetzt. Bei der Isoelektrischen Fokussierung, IF, (Sephadex G 100, 2% Ampholyt T 3-9; Voltstundenprodukt 5 000 Vh) fokussierten die Gallenfarbstoffe in scharfen Banden und fielen teilweise am Isoelektrischen Punkt (IEP, siehe Tabelle 2) aus. Im Gegensatz dazu blieben Chlorophyll bzw. dessen Derivate (Phaeophorbid) am Auftragsort (pH ca. 7) liegen. Die fokussierten Gallenfarbstoffe erwiesen sich nach der Veresterung in der analytischen DC auf Kieselgel (Fließmittel A) bis auf geringfügige Verunreinigungen als rein. Die nach der präparativen Fokussierung in granuliertem Dextrangel ermittelten IEP konnten durch Titrationskurven nach Righetti¹ (Bosisio, et al. 1980) bestätigt werden (Tab. 2). Obwohl sich die IEP nur sehr wenig unterscheiden, ließen sich die mit HCl aus PC bzw. PE abgespaltenen Biline in einer "Mischfokussierung" gut voneinander trennen.

3.1.1. Hauptprodukte der Fokussierung der mit HCl abgespaltenen Biline von PE und PC

Spektral (Tabelle 2) ist der durch Fokussierung aus dem HCl-Rohextrakt von PE isolierte Gallenfarbstoff mit dem von O'Carra et al 1964 beschriebenen "Phycoerythrobilin" identisch; er besitzt wie dieser einen basischen Pyrroleninstickstoff mit einem pKa von 6,4 (vgl. O'Carra et al. 1964 und Pkt. 3.2.1.).

1

Bei der pH-Titration nach Righetti wird in der ersten Dimension durch IF der Träger-Ampholyte ein pH-Gradient in einem Polyacrylamid-Gel aufgebaut. Senkrecht dazu wird die zu prüfende Verbindung aufgetragen und erneut Spannung angelegt; da die Verbindung je nach dem lokalen pH-Wert des Gels unterschiedliche positive bzw. negative Ladungsmengen trägt, ist auch die Wanderungsgeschwindigkeit zur Anode bzw. Kathode unterschiedlich groß. Am IEP findet keine Wanderung statt.

Tabelle 2: Isoelektrische Punkte der fokussierten Gallenfarbstoffe und ihre Spektraldaten

Bilane aus	Spaltung mit	IEP	Lösungsmittel				
			H ₂ O/MeOH	CHCl ₃	CHCl ₃ /H ⁺	MeOH	MeOH, H ⁺
Phycoerythrin	HCl	4.30 ¹	555 nm	520 nm	580 nm		
Phycocyanin	Methanol, T	4.27					680 nm
		4.15					665 nm
Phycocyanin	HCl	4.15 ¹	650 nm	580 nm		574 nm	665 nm
		4.30	680 nm				

¹ Die Isoelektrischen Punkte wurden durch Titrationskurven in Polyacrylamidgel überprüft und ergaben die gleichen Werte.

der Massenpeak des veresterten Pigmentes (m/e = 648 (Abb. 50) schließt aber sowohl ein Ethyliden-PCBdme als auch ein α -Chlor-PCBdme aus. Möglicherweise stellt dieser Chromophor jedoch ein Methoxy-Addukt des Phycoerythrobilins dar: Für eine Addition an den Ring A spricht das gegenüber Phycoerythrobilin stark verschobene Absorptionsmaximum.

Der bei der Fokussierung des HCl-Rohextraktes von Phycocyanin erhaltene Chromophor absorbiert bei 368 nm/685 nm in saurem Methanol. Das veresterte Pigment wandert in Fließmittel A etwas unter PCBdme, ist also etwas polarer. Der Chromsäureabbau setzt aus diesem Bilin neben MEM und HSE ein Imid frei, das knapp unter E-M ES chromatographiert. Ein gleichartiger Gallenfarbstoff tritt auch bei der Fokussierung der Methanolyseprodukte von PC auf. Möglicherweise stellt auch dieses Bilin das Methoxy-Addukt an Ring A dar.

3.1.2. Identifizierung des Bilins mit IEP 4,27 als PCB

Der Gallenfarbstoff mit IEP 4,27 und einer Absorption von 680 nm/370 nm chromatographiert nach seiner Veresterung mit authentischem E-PCBdme. Der Chromsäureabbau liefert neben MEM und HSE ein Imid, daß mit E-M~~A~~ES cochromatographiert. Dieser Bilindme stellt also E-PCBdme dar, obwohl die Maxima des unveresterten Pigmentes gegenüber dem veresterten Pigment um 9 -

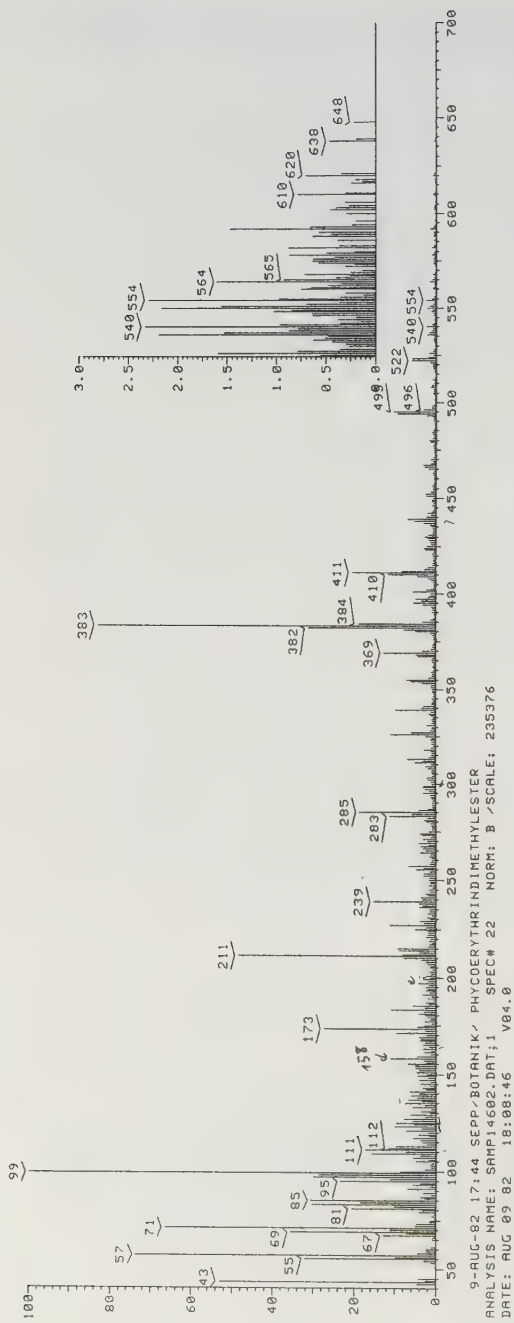


Abb. 50:

7AB-Massenspektrum des durch Fokussierung gereinigten roten Bilins (IEP 4,3) aus der Chromophor-7AB-Fraktion, abspaltung mit HCl von PE

10 nm verschoben sind (Abb. 51). Ein derartiger Unterschied im Absorptionsverhalten der freien Säuren bzw. der veresterten Pigmente ist jedoch in der Literatur von Chapman et al. beschrieben: die freie Säure weist Maxima bei 372 nm/680 nm in saurem Methanol auf, während der veresterte PCBdme bei 689 nm/374 nm absorbiert. (Chapman et al. 1979).

Während das sehr empfindliche α -Chlor-PCB bei der Fokussierung ein nicht endgültig identifiziertes Addukt bildet, kann Ethyliden-Phycocyanobilin als freie Säure in einem Arbeitsschritt relativ reinpräpariert werden. Besonders gut gelingt die Abtrennung von Chlorophyllderivaten, die sämtlich am Auftragspunkt liegen bleiben. Die Aufreinigung eines durch Methanolyse gewonnenen Rohextraktes zu einem spektral einheitlichen PCB ist in der Abb. 51 dargestellt.

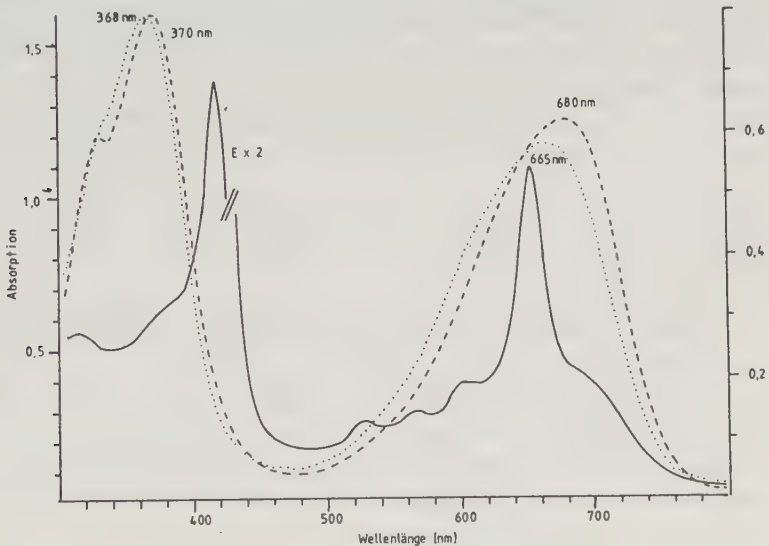


Abb. 51

Die Spektren der unveresterten Gallenfarbstoffe wurden in Methanol/ H_2SO_4 aufgenommen:

- Rohextrakt nach Methanolyse von Phycocyanin (linke vertikale Skala)
- - - Bilin mit IEP 4,3 (rechte vertikale Skala)
- Bilin mit IEP 4,1 (rechte vertikale Skala)

3,5 ml des Rohextraktes (—) wurden in granuliertem Gel focussiert, die Bande mit IEP 4,3 eluiert und in 2 ml Methanol/ H_2SO_4 aufgenommen (---). Bei manchen Fokussierungen trat zusätzlich eine Bande mit IEP 4,1 auf (.....).

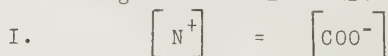
3.2. Ermittlung des Pyrrolenin-pKa der Biline mit IEP 4,15 und 4,3

Da die Protonierung des Pyrrolenin-Stickstoffes zu einer Erhöhung des Extinktionskoeffizienten und zu einer spektralen Verschiebung der Maxima führt (Rüdiger, 1971), kann der pKa-Wert dieses Stickstoffes durch spektrophotometrische Titration bestimmt werden. Man trägt dabei den Quotienten der Extinktion der freien Base (Bilin IEP 4,3 = 515 nm; Bilin IEP 4,15 = 590 nm in Puffer pH 9) und des Hydrochlorids (Bilin IEP 4,3 = 555 nm; Bilin IEP 4,15 = 665 nm in Puffer pH 3) gegen den pH-Wert auf. Der pKa-Wert des Stickstoffes ergibt sich dabei aus dem Schnittpunkt der Kurve und einer Parallelen zur pH-Achse in dem Abstand $E_{\text{freie Base}}/E_{\text{Hydrochlorid}}$, der einer 1 : 1 - Verteilung entspricht. Da sich die Absorptionskurven des Hydrochlorids und der Freien Base überlappen und die Absorptionskoeffizienten unterschiedlich sind (vgl. Rüdiger, 1971), beträgt dieser Quotient 0,93 für das rote Bilin (IEP 4,3) und 0,68 für das blaue Bilin (IEP 4,15). Der pKa wurde für das rote Bilin zu 6,4 für das blaue Bilin zu 5,8 bestimmt (Abb. 50). Wie erwähnt, ist der pKa des Pyrrolenin-Stickstoffes identisch dem von O'Carra 1964 für "Phycoerythrobilin" angegebenen Wert.

3.3. Ermittlung des mittleren pKa-Wertes der Propionsäureseitenketten

Aus dem durch IF ermittelten IEP und dem durch spektrophotometrische Titration bestimmten pKa des Pyrrolenin-Stickstoffes läßt sich der mittlere pKa der beiden Propionsäureseitenketten berechnen; hierbei wird angenommen, daß die beiden Säuregruppen, die z.B. beim Bilirubin 7 A entfernt sind (Hansen, 1979) unabhängig voneinander dissoziieren.

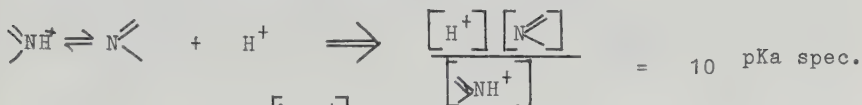
Am IEP beträgt die Nettoladung Null, d.h. positive und negative Ladungen heben sich auf:



Der pKa-Wert des Stickstoffes ist 6,4 bzw. 5,8 für das rote

Bilin IEP 4,3 bzw. das blaue Bilin IEP 4,15.

Weiter gelten folgende Beziehungen:



$$\text{daraus folgt: } \frac{[\text{>NH}^+]}{[\text{>N}]} = 10^{-\text{pKa} + \text{pH}}$$

Für die Carboxyl gruppe gilt analog folgende Beziehung:



Weiterhin ist die Anzahl der freien bzw. protonierten N halb so groß wie die Zahl der protonierten bzw. deprotonierten Gruppen im Molekül:

$$\left([\text{>NH}^+] + [\text{N} <] \right) \times 2 = [-\text{COOH}] + [-\text{COO}^-]$$

Der Quotient N^+/N errechnet sich für das rote Bilin bei einem pKa von 6,4 und einem pH von 4,3 zu 125,9; für das blaue Pigment mit pKa 5,8 und pH 4,15 zu 44,7. Damit ergibt sich für das blaue Pigment ein pKa von 4,45, für das rote Pigment ein Wert von 4,3 für die Carboxylgruppe.

Dieser Wert ist etwas niedriger als der in der Literatur für Propionsäure angegebene Wert von 4,8 bzw. der mittlere pKa-Wert der Carbonylgruppen von Bilirubin (pKa 1 = 4,3; pKa 2 = 5,3 nach Lee et al., 1977), deckt sich aber sehr gut mit dem von Hansen ermittelten Wert von 4,4 für Bilirubin.

Sowohl der durch Spektrophotometrische Titration bestimmte pKa-Wert für den Pyrrolenin-Stickstoff als auch der mittlere pKa-Wert für die Propionsäureseitenketten sind nicht grundsätzlich verschieden von den erwarteten Daten. Damit ist jedoch zweifelsfrei belegt, daß die noch nicht endgültig identifizierten Biline weder am Pyrroleninstickstoff noch an den Carboxylgruppen derivatisiert sind.

4. Untersuchungen zur immunogenen Wirkung des Bilinchromophors

Immunochemische Untersuchungen am System Phycoerythrin - multispezifisches Antiserum hatten Beweise erbracht, daß "chemisch erzeugtes" Apoprotein¹ von Phycoerythrin von gegen das Holoprotein gerichteten Antikörpern erkannt und immunpräzipitiert wird (Sepp, 1981; Sepp et al. 1982). Diese Kreuzreaktion, die im Gegensatz zu den beim Cytochrom C gefundenen Ergebnis steht (Korb und Neupert, 1979) findet z.B. auch bei Phycocyanin und in-vitro synthetisiertem Phycocyanin-Apoprotein (Steinmüller et al. 1983) und dem Vorläufer des Phycocyanin-Apoprotein statt (Schuster et al., 1983a und Schuster et al. 1983b), das heißt, die am speziellen System 'Phycoerythrin - Antikörper' gefundenen Daten lassen sich auch auf andere Biliproteine übertragen. Bei der Immunisierung der Kaninchen mit dem Phycoerythrinantigen werden keine gegen die Chromophorregion gerichteten Antikörper erzeugt; dieses Fehlen ist wohl darauf zurückzuführen, daß der Phycoerythrinchromophor (Abb. 52) aufgrund seiner großen strukturellen Verwandtschaft mit körpereigenem Bilirubin (Abb. 52) nicht als Fremdkörper erkannt wird. Bilinspezifische Antikörper treten auch in anderen Systemen nicht auf: eine Kreuzreaktion von PC-spezifischen Antikörperen mit Allophycocyanin, das den gleichen Bilinchromophor besitzt tritt nicht auf (Bogorad, 1975 und Referenzen). Da die Antiseren durch Immunisierung mit nativen Phycobilisomen (Sepp et al. 1982) erzeugt wurden, kann das Fehlen spezifischer Antikörper auch dadurch erklärt werden, daß die Chromophorregion durch das Protein maskiert wird. Das Bilin liegt z.B. beim PC nicht auf der Moleküloberfläche (Schirmer et al. 1985), obwohl es wässrigen Lösungen zugänglich ist (Scheer, 1981).

¹ Ein Apoprotein-Analogon wurde durch schrittweisen Abbau des Bilinchromophors, Reduktion der mittleren Methinbrücke (Kufer et al. 1982), Diazospaltung (Kufer, et al. 1982) und Chromsäureabbau erzeugt.

Die roten PECP (Präp. vgl. Köst, 1974 und Köst-Reyes, 1978) wurden mit Glutardialdehyd (Avrameas und Tendryck, 1969) an Haemocyanin¹ bzw. an CNBr-aktivierte Sepharose (Firmenvorschrift/Pharmacia) gekoppelt. Die Haemocyanin-PECP-Konjugate wiesen eine Extinktion von 3.75/ml auf; der Gehalt an Haemocyanin betrug 9.5 mg/ml. Die PECP-spezifische Absorption (E 555 nm in PBS-Puffer) des Sepharose-Konjugates betrug 0.24/ml und g Sepharose-PECP-Konjugat. Je 5 Kaninchen wurden mit dem Sepharose-Konjugat (PE-S-Antiseren) bzw. dem Haemocyanin-Konjugat (PE-HC-Antiseren) immunisiert.

4.2. Ausschluß von Hapten-spezifischen Antikörpern

In den HC-PE-Antiseren ließen sich zwar für den Träger Haemocyanin spezifische Antikörper im Ouchterlony-Test (Ouchterlony, 1949) nachweisen; größere Mengen gegen das Bilin-Hapten gerichtete Antikörper waren sowohl in den PE-HC-Seren als auch in den PE-S-Seren auszuschließen: Weder war nach Zusatz des Antikörpers zu einer Lösung von PECP eine Änderung des Absorptionsspektrums feststellbar (vgl. Metzger et al. 1963) noch ließen sich Hapten-Antikörperkomplexe in Agarosegelen (Yagi, 1962) in einem modifizierten Ouchterlony-Test bzw. in Lösung mit Ammoniumsulfat bzw. Antikaninchen-IgG (Migdley und Hepburn, 1980) abtrennen.

Um auch geringe Mengen an PECP-spezifischen Antikörpern ausschließen zu können wurde ein Postpräzipitationstest (vgl. Minden 1975) mit ¹⁴C-PECP angesetzt². Dazu wurden in drei

¹ Für die großzügige Überlassung von Haemocyanin möchte ich Dr. Eichinger und Prof. Dr. Linzen sehr herzlich danken

² ¹⁴C-PECP können durch Anzucht der Algen in ¹⁴C-haltigem Medium relativ leicht erhalten werden. Die Postpräzipitation favorisierte man gegenüber einem ELISA-Test, da kleine Peptid-Haptene schlecht an die Oberfläche von Mikrotitrierplatten koppeln (Briand et al. 1985) und deshalb an ein Trägerprotein gekoppelt werden müssen. Dabei ist eine erneute Kopplung mit Glutardialdehyd zu vermeiden, da sonst falsch-positive Ergebnisse durch kopplungsreagenz-spezifische Antikörper auftreten können (Goodfriend et al. 1964).

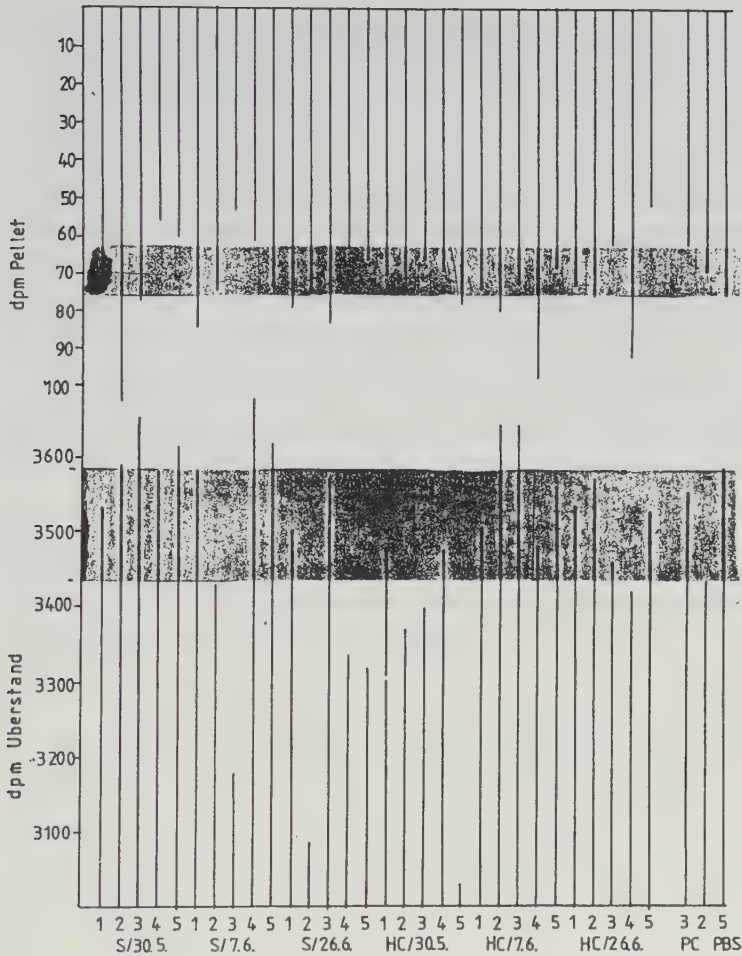


Abb. 53

Die Gesamtaktivität im Pellet (dpm) bzw. im Gesamtüberstand (dpm) sind für jedes Serum und die Nullproben gegenübergestellt. Nur bei dem Serum HC 5, Blutung am 30.5. ist gleichzeitig die Radioaktivität im Pellet größer und die Radioaktivität im Überstand geringer als bei den Nullproben (grau unterlegt). Die Werte für die nachfolgenden Blutungen liegen aber auch bei diesen Serum wieder in den Nullbereichen.

parallel behandelten Proben ^{14}C -PECP ($E_{555\text{ nm}} = 0,29$; 35 000 dpm/ml¹; 100 μl /Ansatz) mit 1:10-verdünntem Antiserum versetzt (PE-HC 1-5; PE-S 1-5, je drei Blutungen sowie unspezifisches Serum PC 2, PC 3, PBS; jeweils 20 μl /Ansatz). Durch Zusatz von 20 μl Anti-IgG-Antikörper (0,5 mg/ml, Sigma)² wurde der primäre Antikörper (= Kaninchen-IgG) präzipitiert. Die Radioaktivität in den Überständen sowie in den Immunpräzipitaten wurde im Szintillationszähler anhand einer vorher eingespeicherten Quenchkurve bestimmt. (vgl. Tab.).

In Abb. 53 sind die in dem Gesamtüberstand bzw. im Gesamtpellet gefundenen Werte für jedes Serum aufgetragen. Wir halten es aus folgenden Gründen für erwiesen, daß die Schwankungen in den dpm-Werten ($\sigma(n-1) = 175,6$ für die dpm-Werte des Überstandes) zufällig sind und nicht auf die Präzipitation von PECP-Antikörper-Komplexen hindeuten:

Bei einer spezifischen Fällung von PECP muß gleichzeitig die Radioaktivität im Gesamtüberstand verringert sein und die Radioaktivität im Gesamtpellet erhöht sein. Wie Abb. 53 zeigt, ist jedoch nur bei einem Serum HC5, 30.5. diese Bedingung erfüllt, d.h. die Radioaktivität im Überstand ist geringer, die die Pellet höher als bei den Nullproben (Abb. 53, grau unterlegt). Abgesehen davon, daß die dpm im Gesamtpellet nur geringfügig über den Nullproben liegen, zeigt auch der Vergleich mit Werten für die nachfolgenden Blutungen (HC 5/ 7.6. bzw. 26.6), daß diese Schwankung unspezifisch ist: Die für die nachfolgenden Blutungen bestimmten Werte des Überstandes wie auch des Pellets unterscheiden sich nicht von dem durch die Nullproben abgegrenzten Bereich (Abb. 53). Wir halten es daher für erwiesen, daß die Seren keine gegen die Chromophorregion gerichteten Antikörper enthalten. Wahrscheinlich erkennt das Immunsystem den Phycocerythrin-Chromophor aufgrund seiner nahen strukturellen Verwandtschaft zu körpereigenem Bilirubin (Abb. 52) nicht als Fremdkörper und bildet deshalb keine Antikörper gegen diese Struktur aus.

¹ im Exp. Teil finden sich Tabellen zur ^{14}C -Aufnahme durch die Algalen sowie zur Bestimmung der Radioaktivität bei den einzelnen Aufarbeitungsschritten.

² Optimale Präzipitation der Kaninchen-IgG durch Anti-Kaninchen-IgG findet im Bereich von 0,01 mg Antikaninchen-IgG zu 2,5 - 1,25 μl PE-HC- bzw. PE-S-Serum statt.

5. Untersuchung auf pyrrolische Substanzen im Medium von Synechococcus 6301 unter Schwefelmangelbedingungen

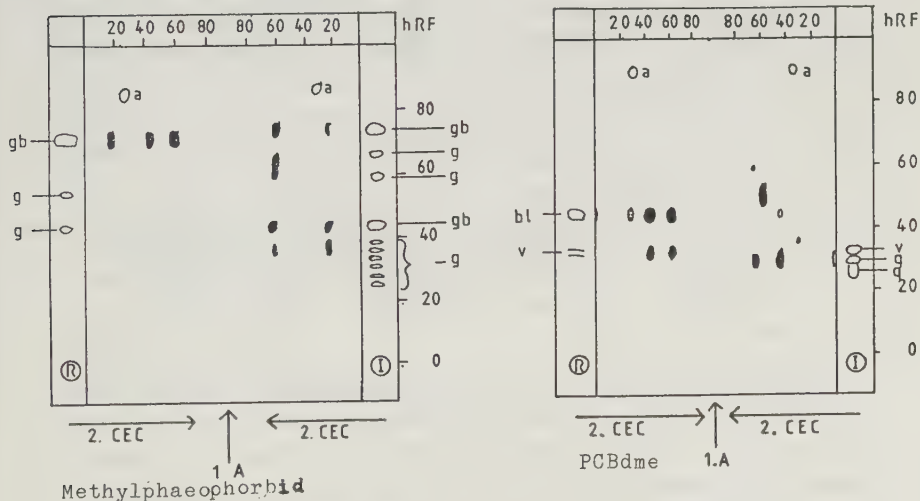
Bei vermindertem Stoffwechsel, bedingt durch N-, P-, S-, K-, und Fe-Mangel verändert sich sowohl die Pigmentzusammensetzung als auch die innere Morphologie von Algenzellen sehr stark. Verschiedene Grünalgen synthetisieren bei N-Mangel Sekundär-carotenoide (Czygan 1968); die Rotalge *Porphyridium cruentum* reduziert unter N- bzw. S-Mangel ihre Phycobilisomen und Membranoberflächen (Köst et al, 1984; Wanner und Köst 1984). Unter S-Mangel bildet *Synechococcus* bei gleichzeitigem Ausbleichen von PC und Chlorophyll den Speicherstoff Polyhydroxybuttersäure (Henkelmann 1983; Wanner et al, 1986) bzw. reduziert unter N-Mangel Carotenoide und PC (Szalontai und Csuborday, 1979). Unter Schwefelmangelbedingungen fällt neben dem Ausbleichen von PC und Chlorophyll eine ausgeprägte Gelbfärbung des Mediums auf. Nach der Abtrennung der Algen läßt sich aus diesem Schwefelmangelmedium mit Butanol ein gelb gefärbter Extrakt gewinnen.

5.1. Nachweis von Benzidimpositiven Substanzen im Medium durch Chromsäureabbau von verestertem und unverestertem Extrakt.

Sowohl durch Extraktion des Mediums mit Butanol und anschließender Veresterung mit H_2SO_4 /Methanol als auch durch Extraktion von gefriergetrocknetem Medium läßt sich ein gelb gefärbter Extrakt gewinnen, dessen Inhaltsstoffe sich von den intrazellulären Farbstoffen dünnschichtchromatographisch unterscheiden lassen. Wie die Abb. 54 zeigt, werden bei der 2-Dimensionalen DC (vgl. Experimenteller Teil; 1. Dimension: Chromatographie der Farbstoffe 2. Dimension: Chromatographie der Imide nach Chromsäureabbau) Unterschiede zwischen verestertem und unverestertem Extrakt deutlich:

5.2. Inkubation von PCBdme und Methylphaeophorbid in Methanol unter photooxidativen Bedingungen

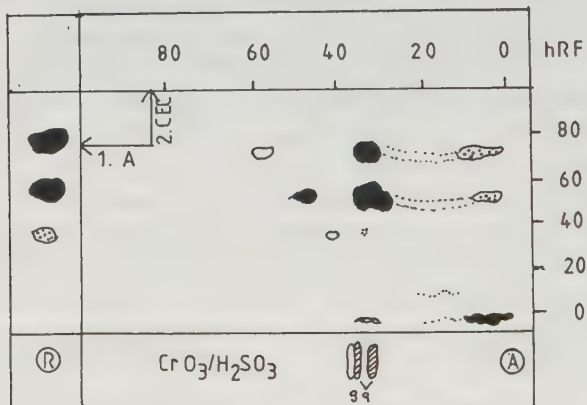
Da Synechococcus 6301 unter Schwefelmangelbedingungen sowohl PC als auch Chlorophyll abbaut (Wanner et al. 1985), wurde untersucht, ob Methylphaeophorbid und PCBdme, unter photooxidativen Bedingungen inkubiert, polare pyrrolische Substanzen liefern. Sowohl Methylphaeophorbid als auch PCBdme werden durch Photooxidationsprozesse zu polareren Pigmenten (Abb. 55) abgebaut. Methylphaeophorbid ist nach einer Woche Inkubation zum größten Teil verschwunden; stattdessen erhält man ein Porphyrin mit deutlich verschobenem blauen und roten Maximum (Methylphaeophorbid 668 nm/402 nm; neues Porphyrin 666 nm/409 nm, weitere Maxima siehe Exp. Teil). Noch stärker ist die Umwandlung von PCBdme; die Lösung weist keine Maxima im sichtbaren Bereich auf. Bei der 2-dimensionalen DC ließen sich bei beiden Inkubationsmischungen polarere Pigmente nachweisen, die durch Chromsäure zu benzidinpositiven Substanzen abgebaut werden.



- b. 55 Vergleich der durch Chromsäureabbau erhaltenen TMB-positiven Imide bei in Methanol photooxidierten PCBdme, Methylphaeophorbid a und den jeweiligen Dunkelproben
Entwickelt wurde in der 1. Dimension mit Fließmittel A, in der 2. Dimension, nach Chromsäureabbau, in Fließmittel CEC (vgl. Pfeile; die hRF-Werte für CEC finden sich in der waagrechten Reihe, die für A in der senkrechten Reihe). Als Marker für die DC der Imide diente β -HCLIS (a).
gb = grünbraun g = gelb bl = blau v = violett q = farblos; quencht Fluoreszenz im UV
Verwendete Platten: Kieselgel G mit Fluoreszenzindikator für die DC (Merck)

5.3. Inkubation von PCB (freie Säure) in "Schwefelmangelmedium".

Im Gegensatz zur Inkubation von PCB in Methanol schlägt bei der Inkubation in Medium die Farbe schon innerhalb 1 h um. Nach 40 h ist die Lösung völlig entfärbt. Nach Extraktion und Veresterung erhält man in der 2-D-DC ein dem im Mangel von *Synechococcus* auftretenden Muster sehr ähnliches Bild (Abb. 56i).



2-DC-Analyse von in Medium inkubiertem PCB

1. Dimension Fließmittel A (hRF-Werte waagrecht) 2. Dimension, nach Chromsäureabbau, CEC (hRF-Werte senkrecht); als Referenz für die DC in der zweiten Dimension diente der Chromsäureabbau von E-PCBdme. g = gelb q = farblos, quecht Fluoreszenz im UV. Fallende Konzentrationen in dieser Reihe:

■ □ □ □

Aufgrund dieser Ergebnisse ist wahrscheinlich, daß die oben beschriebenen Produkte auf nicht enzymatischem Weg durch Photooxidationsprozesse gebildet werden. Als direkter Vorläufer kommt neben oder gleichzeitig mit PCB auch ein Porphyrin in Frage, da sowohl PCB als auch Methylphaeophorbid unter photooxidativen Bedingungen zu polareren Pigmenten umgesetzt werden, aus denen durch Chromsäure benzidinpositive Bruchstücke freigesetzt werden.

EXPERIMENTELLER TEIL

6. Allgemeine Vorbemerkungen

6.1. Geräte, Chemikalien und Algenanzuchtmedien

Geräte

Zentrifugen: Je nach Größe des Ansatzes wurden Algen bzw. Niederschläge mit einer WKF G 50 K (Brandau/Darmstadt), einer Hettich Mikroliter-Zentrifuge bzw. einer Hettich-Tischzentrifuge EBA 3 S (Hettich/Tuttlingen) abzentrifugiert. Je nach Erfordernissen führte man die Zentrifugationen bei letzteren Zentrifugen in einem Kühlraum durch.

Photometer: Spektren wurden mit einem Unicam SP 1800 Ultraviolet Spectrophotometer bzw. einem Perkin Elmer 320 Spektrophotometer aufgenommen. (Hitachi/Tokyo).

Isoelektrische Fokussierungen wurden mit dem Multiphor 2117 der Firma LKB/Bromma/Schweden durchgeführt.

pH-Bestimmungen führte man mit einem Knick Digital-pH-Meter 646 der Fa. Bachhofer, Reutlingen durch.

Radioaktivitätsbestimmung: Szintillationsmessungen wurden in einem Betamatic Liquid Szintillation Counter der Fa. Kontron durchgeführt.

Fluoreszenzmessung: erfolgte qualitativ mit einem Fluotest Universal (Quarzlampen GmbH, Hanau)

Chemikalien

Alle wässrigen Lösungen wurden mit demineralisiertem Wasser hergestellt. Reagentien hatten den Reinheitsgrad "zur Analyse"; organische Lösungsmittel für die Spektroskopie wurden neutralisiert und getrocknet (CHCl_3) bzw. nur glasdestilliertes Methanol verwendet, organische Lösungsmittel für Fließmittel waren vom Reinheitsgrad "zur Analyse".

Medium für Porphyridium cruentum

NaCl	27,0 g/l
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	6,6 g/l
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	5,6 g/l
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	1,5 g/l
KNO ₃	1,0 g/l
KH ₂ PO ₄	70,0 mg/l
NaHCO ₃	40,0 mg/l
1 M TRIS-HCl,	
pH 7.3 - 7.6	20,0 ml/l
Chelat Eisen	1,0 ml/l
Spurenelemente	1,0 ml/l
In 1 Liter Spuren	

In 1 Liter Spurenelementlösung sind
enthalten:

ZnCl ₂	40,0 mg/l
H ₃ BO ₃	600,0 mg/l
CoCl ₂ x 6H ₂ O	15,0 mg/l
CuCl ₂ x 6H ₂ O	40,0 mg/l
MnCl ₂ x 4H ₂ O	40, 0 mg/l
(NH ₄) ₂ MoO ₇ ·4H ₂ O	370, 0 mg/l

1 l Chelateisen enthält:

FeCl ₃ x 6H ₂ O	2,4 g/l
0.05 M EdTA	1000 ml

Medium für Synechococcus 6301:

Schwefelmangelmedium

Die verwendete 0.1M MgSO₄-Lösung wird durch die gleiche Menge
0.1 M MgCl₂ x 4H₂O (20.3 g/l) ersetzt.

Für 1 l Normalmedium:

0.2 ml 1M K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	(228.2 g/l)
3.0 ml 0.1M MgSO ₄ ·7H ₂ O	(24.7 g/l)
2.5 ml 0.1M CaCl ₂ ·2H ₂ O	(14.7 g/l)
0.3 ml 0.1M Citronensäure·2H ₂ O	(21.0 g/l)
2.0 ml 0.008M Ammoniumeisen-III-citrat	(3.0 g/l)
25.0 ul 0.1M EDTA-Titriplex III·2H ₂ O	(10.0 g/250 ml)
4.0 ml 0.1M Na ₂ CO ₃	(10.0 g/l)
10.0 ml 1.6M NaNO ₃	(150.0 g/l)
1.0 ml Spurenelement-Lösung	

* 1 l Spurenelement-Lösung enthält:

2860 mg H ₃ BO ₃
2200 mg MnCl ₂ ·6H ₂ O
2220 mg ZnSO ₄ ·7H ₂ O
390 mg Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O
79 mg CuSO ₄ ·5H ₂ O
49 mg Co(NH ₃) ₂ ·6H ₂ O

6.2. Arbeiten mit Bilinen, Bilindmes, Bilipeptiden und Bili-proteinen

Alle Arbeiten mit Bilinen, Bilindmes sowie Bilipeptiden erfolgten in einem abgedunkelten Raum, die Lösungen wurden zusätzlich durch Alufolie vor Licht geschützt und - wenn möglich - eisgekühlt. Die Aufarbeitung von Biliproteinen erfolgte ebenfalls unter Lichtschutz bei 4° C.

Für eine Lagerung $t > 0.5$ h wurden die Lösungen von Gallenfarbstoffen bzw. Gallenfarbstoffestern und Bilipeptiden stets mit Stickstoff abgeblasen bzw. bei größerem Volumen am Rotationsverdampfer zur Trockene gebracht (T: 20°- 30° C) und dunkel bei mindestens -19° C aufbewahrt.

6.3. Dünnschichtchromatographie

6.3.1. Durchführung der Dünnschichtchromatographie

Die DC erfolgte aufsteigend in einer mit Fließmitteldampf gesättigten Kammer, die durch einen Karton vor Lichteinfall geschützt wurde. Da die hRF-Werte der Bilindmes bei der DC relativ stark variieren, wurde immer eine Referenz aufgetragen; die angegebenen hRF-Werte sind Durchschnittswerte.

Soweit nicht anders vermerkt, wurden HPTLC-Platten (Fa. Merck, für die NANO-DC; Kieselgel G ohne Fluoreszenzindikator) verwendet. Zusätzlich kamen zur Anwendung: Kieselgel GF-Platten (Fa. Merck, für die DC, 20 x 10 cm, Kieselgel GF mit Fluoreszenzindikator 245 nm), die je nach Substanzmenge mit einem Glasschneider zerteilt wurden. Die Laufstrecke betrug maximal 10 cm. Selbstgestrichene Platten: Die Beschichtung der Platten (20 x 20 cm²; Schichtdicke 0,25 mm) mit Kieselgel G mit oder ohne Fluoreszenzindikator (245 nm) erfolgte nach Stahl (Stahl, E. 1967) mit einem Streichgerät und einer Arbeitsschiene von Desaga, Heidelberg. Kieselgelemlusion: 42 g Kieselgel/100 ml H₂O dest. Vor Gebrauch wurden die Platten bei 120° C 2 h im Trockenschrank aktiviert; nach einer Lagerung von mehr als zwei Tagen wurde die Aktivierung wiederholt.

6.3.2. Präparative Dünnschichtchromatographie

Die verwendeten Platten für die präparative DC sind bei den einzelnen Kapiteln angegeben; wenn nicht anders vermerkt, wurden HPTLC-Platten verwendet.

Die zu chromatographierende Substanz wurde in Aceton gelöst und mit einer Pasteurpipette strichförmig aufgetragen. Nach dem Antrocknen wurde die Platte mehrmals in Aceton "vorchromatographiert": die aufgetragenen Pigmente werden dadurch zu einem scharfen Strich fokussiert. Nach dem vollständigen Verdunsten des Acetons wurde im jeweiligen Fließmittel entwickelt.

6.3.3. Analytische Dünnschichtchromatographie

Bilindme

Die Bilindme wurden in Aceton gelöst und mit einer dünnen Glaskapillare punktförmig aufgetragen; nach einem Vorlauf in Aceton (siehe oben) chromatographierte man im jeweiligen Fließmittel.

Imide

Imide wurden in Aceton oder Essigester gelöst und mit einer Glaskapillare punktförmig aufgetragen; nach einem Vorlauf in Aceton (siehe oben) wurde im jeweiligen Fließmittel entwickelt. Wurden die Imide durch einen Chromsäureabbau auf der Platte dargestellt, wurde so oft in Aceton chromatographiert, bis die Acetonfront keine Einbuchtungen mehr zeigt. Referenzimide wurden entweder durch Chromsäure direkt auf der Platte erzeugt oder das aufgetragene Imid mit einem Tropfen Chromsäure versetzt.

6.4. Fließmittel für die Dünnschichtchromatographie

6.4.1. Fließmittel für die DC von Bilindme

Die Kurzbezeichnung für das verwendete Fließmittelsystem wird bei den einzelnen Kapiteln angegeben. Die Platten wurden 1 x entwickelt.

			<u>Teile</u>
<u>FA</u>	<u>Fließmittel A</u>	Benzol	48,5
		Petrolether (Kp. 40°-60° C)	40,0
		Methanol	10,5
		Essigsäureethylester	9,0

<u>TE</u>	Tetrachlorkohlenstoff	1
	Essigsäureethylester	1
<u>TES</u>	Tetrachlorkohlenstoff	50
	Essigsäureethylester	50
	Eisessig	1
<u>TEH</u> ⁺	Tetrachlorkohlenstoff	5
	Essigsäureethylester	5
	6% H ₂ SO ₄ in Methanol	2 Tropfen

6.4.2. Fließmittelsysteme für die DC von Imiden

Bei Verwendung des Systems BDE wurden die Platten 2 x bei gleicher Laufstrecke entwickelt, das Fließmittel zwischen beiden Läufen vollständig verdunstet. Sonst wurde 1 x entwickelt; Kurzbezeichnung der Systeme findet sich bei den jeweiligen Kapiteln.

		<u>Teile</u>
<u>BDE</u>	Benzol	100
	Dioxan	8
	Eisessig	0.3
<u>CEC</u>	Chloroform	6
	Essigsäureethylester	3
	Cyclohexan	1
<u>TEC</u>	Tetrachlorkohlenstoff	6
	Essigsäureethylester	3
	Cyclohexan	1
<u>TEC 2</u>	Tetrachlorkohlenstoff	4
	Essigsäureethylester	4
	Cyclohexan	1

6.4. Lösungsmittel für die UV-VIS-Spektroskopie und Durchführung

Qualitative Spektren wurden an einem Perkin-Elmer-Spektrophotometer (Wellenlänge unter 340 nm) bzw. an einem Unicam-Spektrophotometer (verfügbarer Wellenbereich 340 nm - 700 nm) aufgenommen. Bei ersterem wurde eine vorher eingespeicherte Nulllinie automatisch über den ganzen Bereich des Spektrums abgezogen, bei letzterem wurde am (erwarteten) Absorptionsmaximum des Bilin(dme)s der Nullpunkt manuell eingestellt; die Einstellung des Nullpunkts erfolgte mit dem jeweiligen Lösungsmittel.

Quantitative Spektren wurden am Perkin-Elmer-Spektrophotometer aufgenommen (siehe oben; Ausnahme: thiolhalige Lösungsmittel). Alle Spektren wurden in Quarzküvetten aufgenommen.

Lösungsmittel

Neutrales Chloroform

Kurz vor der Spektroskopie wurde p.A. Chloroform mit H_2O dest. (dreifaches Volumen) gewaschen und durch Filtration über Zellulose getrocknet.

Saures Chloroform

P.A. Chloroform wurde mit 1 Volumenteil HCl konz. geschüttelt und durch Filtration über Zellulose getrocknet.

Saures Methanol

Zu 1,5 ml p.A. Methanol (glasdestilliert) wurden 0.1 ml 6% H_2SO_4 -Methanol (w/w) pipettiert; das entspricht 0.0375 % H_2SO_4 .

7. Struktur des durch Abspaltung mit Salzsäure aus Phycocyanin erhaltenen Bilins (=HCl-PCB)

7.1. Abspaltung des Bilins mit Methanol: Darstellung von Phycocyanobilin

40 g Algenpulver (Spirulina maxima; sprühgetrocknet) wurden 4 x in je 200 ml heißem MeOH aufgenommen und abgenutscht. Der Algenrückstand wurde in 400 ml MeOH 4 h unter Rückfluß gekocht und abgenutscht. Das Filtrat wurde am Rotationsverdampfer ($20^\circ C$) zur Trockene gebracht und tiefgefroren. Den Algenrückstand

kochte man noch mehrmals (3 - 4 mal, je nach Farbe des Rückstan- des mit Methanol (siehe oben). Die Extrakte wurden am Rotations- verdampfer (20° C) eingengt und mit 6 % H₂SO₄-MeOH verestert. (vgl. Pkt. 7.3.)

7.2. Abspaltung des Bilins mit HCl konz.: Darstellung von HCl-PCB

7.2.1. Reinigung von Phycocyanin aus Spirulina maxima

Sprühgetrocknete Zellen (*Spirulina maxima*) wurden in dest. Was- ser suspendiert und durch 3maliges Einfrieren (-19° C) und Auf- tauen (Wasserbad, 25° C) weiter aufgebrochen. Die Algensuspension wurde mit H₂O dest. (250 ml/g Trockengewicht Algen) ver- dünnt, 15' im Eisbad gerührt und bei 8 000 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde bei 4° C aufbewahrt, die abzentrifugierten Algen extrahierte man wie oben (250 ml/2 g Trockengewicht Algen) und zentrifugierte erneut bei 8 000 g. Die vereinigten Überstände absorbierten bei 624 nm, 420 nm und 400 nm (624 nm/420 nm = 3,3; 624 nm/400 nm = 2,4)¹. Für Vorversuche bzw. für die präparative Gewinnung von HCl-PCB (PC > 0,5 g) wurden diese, nach Dialyse gefriergetrockneten Überstände verwendet.

Für die präparative Gewinnung von HCl-PCB (PC < 0.5 g) wurde weiter aufgereinigt: Das gefriergetrocknete Roh-PC wurde in 0,1 M TRIS/HCl-Puffer (pH 8) aufgenommen und mit Ammoniumsulfat fraktio- niert gefällt. Nach Zugabe der entsprechenden Menge an Ammonium- sulfat (20 %, 40% bzw. 60 % Sättigung) wurde unter Eiskühlung 30' gerührt und bei 16 000 Upm (100 ml-Rotor) zentrifugiert. Das Pellet der 40% Fällung wurde in dest. Wasser resuspendiert, gegen dest. Wasser dialysiert und gefriergetrocknet ($E_{624 \text{ nm}}/E_{410 \text{ nm}}$ = 10,1 in dest. Wasser). Das Pellet der 60%-Fällung ($E_{624 \text{ nm}}/E_{410 \text{ nm}}$ = 3, Schulter bei 650 nm, in dest. Wasser) wurde nach Dialyse und Gefriertrocknung für präparative Gewinnung von HCl- PCB (PC < 0,5 g) eingesetzt.

¹ Teilweise enthielt der Rohextrakt noch größere Mengen Chlorophyll bzw. dessen Derivate (starke Schulter oder Nebenpeak bei 650 nm). Das Chlorophyll wurde durch Fällung mit CaCl₂ (15 mM; 10' Rühren im Eisbad, 20' Zentrifugation bei 30 000 g) abgetrennt (vgl. Thümmel, F. 1984)

Für analytische Versuche wurde das PC durch Chromatographie an DEAE-Zellulose weiter aufgereinigt. (vgl. Kufer, W. 1980). Gefriergetrocknetes Phycocyanin wurde in 10 mM TRIS/HCl-Puffer (pH 8) aufgenommen, 20' bei 30 000 g abzentrifugiert und der Überstand auf eine mit demselben Puffer (10 mM TRIS/HCl, pH 8) äquilibrierte DEAE-Zellulose-Säule (2,5 cm - 18 cm) aufgetragen. Die maximale Eindringtiefe betrug 4 cm. Die Säule wurde mit 200 ml Startpuffer (10 mM TRIS/HCl, pH 8) dann mit einem linearen KCl-Gradienten (600 ml; 0-300 mM KCl in Startpuffer) entwickelt. Die Elutionsgeschwindigkeit betrug 150 ml/h. Verwendet wurden die Fraktionen mit $E_{620 \text{ nm}}/280 \text{ nm} > 2$ und spektral nicht nachweisbaren Chlorophyllderivaten.

7.2.2. Abspaltung des Bilinchromophors mit HCl konz.

7.2.2.1. Ermittlung der optimalen Zeit bzw. Temperatur für die Bilinabspaltung mit HCl konz.

DEAE-PC wurde in HCl konz. gelöst ($E_{668 \text{ nm}} = 6/\text{ml HCl konz.}$) nach 20', 40', 50', 90', 150' und 240' Reaktionsdauer nahm man ein Spektrum in HCl konz. (1 : 4) auf und extrahierte je 10, 5, 4, 2,5, 2,5, 2,5 ml (vgl. Tabelle 4) mit 4 ml MeOH/ CHCl_3 (1:2). Jeweils 500 μl der getrockneten organischen Phase verdünnte man mit 2000 μl MeOH und nahm erneut ein Spektrum auf, der Rest der Lösung wurde durch Zusatz von 6% $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{MeOH}$ verestert. Die wieder extrahierten Bilindme wurden teils in der DC, teils spektral in saurem Methanol analysiert (Fließmittel für die DC: TE und A.)

Für die Bestimmung der optimalen Temperatur löste man DEAE-PC in HCl konz. (15 ml, $E_{668 \text{ nm}} = 1$). Nach 1 h Inkubation bei -19, 4 bzw. 22° C extrahierte man quantitativ in MeOH/ CHCl_3 (1:2) und veresterte durch Zusatz von 6% $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{MeOH}$. Die Volumina der Veresterungsgemische betrugen 8 ml. Man extrahierte die veresterten Biline quantitativ in 4 ml CHCl_3 und nahm erneut ein Spektrum auf; die auf gleiches Volumen bzw. gleiche Geräteempfindlichkeit innerhalb einer senkrechten Reihe korrigierten Extinktionswerte finden sich in der Tabelle 3. Analytische DC erfolgte in Fließmittel TE und A.

Für die allgemeinen Arbeitsweisen vgl. Pkts. 7.2.2.3. und 7.3.2.

Abspaltungstemp. °C	Extinktion in HCl konz.		Extinktion in H ₂ SO ₄ /MeOH/CHCl ₃		Extinktion der Dme in saurem MeOH	
	608 nm	668 nm	612 nm	650 nm	612 nm	650 nm
- 19	8,0	11,4	5,2	5,6	1,5	1,9
4	9,4	11,0	7,4	7,6	3,0	3,6
22	10,3	12,4	15,2	14,6	6,2	7,2

Tabelle 3

Ermittlung der optimalen Abspaltungstemperatur

Nach einer Stunde Reaktionsdauer wurden jeweils 5 ml des Reaktionsgemisches extrahiert, verestert und die Extinktion der Bilindme nach Extraktion aus dem Veresterungsgemisch bestimmt. Die Extinktionswerte sind auf gleiche Verdünnung korrigiert (innerhalb einer senkrechten Reihe).

Reaktionsdauer in Minuten	entnommenes Volumen (ml) f.d. Extrakt.	Extinktion in HCl konz.		Extinktion in MeOH/CHCl ₃ 4:1		Extinktion der Dme saurem Methanol		E _{650 nm}
		608 nm	668 nm	608 nm	660 nm	592 nm	650 nm	E _{592 nm}
20	10	9,2	10,2	3,4	4,8	3,6	6,2	1,72
40	5	10,8	10,2	6,8	10,8	6,0	10,8	1,80
60	4	11,0	10,2	10,5	14,0	7,5	13,5	1,80
90	2,5	14,0	10,2	20,0	23,2	12,8	18,4	1,44
150	2,5	14,4	10,2	22,4	24,8	14,4	16,8	1,17
240	2,5	16,8	8,0	16,0	16,8	11,2	12,0	1,07

Tabelle 4

Ermittlung der optimalen Reaktionsdauer für die Abspaltung des Phycocyaninchromophors mit HCl. Aufgeführt sind die auf gleiches Entnahmenvolumen korrigierten Extinktionswerte im Absorptionsmaximum der Biline im Abspaltungsgemisch (HCl konz.) bzw. im (sauren) Extraktionsgemisch (MeOH : CHCl₃ = 4 : 1) sowie der veresterten Biline in saurem Methanol. Die Extinktion wurde bei den Wellenlängen bestimmt, wo entweder beim 20'- und/oder dem 240'-Wert ein Absorptionsmaximum auftrat. Die Extinktionswerte sind jeweils nur in den senkrechten Reihen vergleichbar.

7.2.2.2. Präparativer Ansatz (PC > 0,5 g)

Gefriergetrocknetes PC wurde in HCl konz. (10 ml/0,1 g) bei RT im Dunklen unter Luftausschluß magnetisch gerührt. Nach 1 h wurde die Reaktionsmischung (E_{max} 660 nm bzw. 384 nm) im Eisbad gekühlt und mit 1 Volumenteil MeOH und 2 Volumenteilen CHCl₃ versetzt; anschließend gab man unter ständigem Rühren das 4fache (bezogen auf das HCl-Volumen) Eiswasser zu. Die Temperatur soll bei der Extraktion 10° C nicht übersteigen. Ausgefallenes Protein wurde abgenutscht und das Filtrat erneut mit CHCl₃ extrahiert.

Auftretende Emulsionen wurden durch Abnutschen über wasserfreiem Na_2SO_4 gebrochen. Die vereinigten Chloroformextrakte wurden mit Eiswasser neutral (pH-Papier) gewaschen, durch Filtration über (vorher mit CHCl_3 gewaschene) Watte getrocknet und am Rotationsverdampfer eingeeengt.

7.2.2.3. Präparativer Ansatz (PC < 0,5 g) und analytischer Ansatz

Die Abspaltung des Chromophors mit HCl erfolgte wie oben, jedoch ohne Rühren. Nach Zusatz von methanolischem Chloroform ($\text{MeOH} : \text{CHCl}_3 = 1 : 2$; insgesamt 3faches HCl-Volumen) unter Eiskühlung gab man das 4fache Volumen Eiswasser (dest.) zu und zentrifugierte (5'; TZ 8 000 Upm). Die bilinhaltige Chloroformphase wurde durch Waschen mit Eiswasser (dest.) neutralisiert (pH-Papier); wobei jeweils nach der Zugabe von dest. Wasser zentrifugiert wurde. Die weitere Aufarbeitung erfolgte analog Pkt. 7.2.2.1.

7.3. Veresterung der Chromophore

7.3.1. Präparativer Ansatz (Veresterungsgemisch ≤ 10 ml)

Wasserfreie Biline wurden in 6 % H_2SO_4 -MeOH (6% H_2SO_4 , w/w) 14 h bei -19°C (oder 4h bei 4°C bzw. 1h bei 20°C) inkubiert. Das Veresterungsgemisch wurde mit eiskaltem CHCl_3 versetzt (25 ml / 10 ml MeOH, $E_{660\text{ nm}}$ ca. 3-4) und langsam Eiswasser (dest) zugegeben. Die stark gefärbte Chloroformphase wurde mit eiskaltem Wasser (dest.; 400 ml) neutral gewaschen, durch Filtration über Watte (siehe oben) von Wasser befreit und am Rotationsverdampfer eingeeengt.

7.3.2. Ansatz mit Veresterungsgemischen > 10 ml

Veresterung und Extraktion der Bilindme erfolgte im Prinzip wie unter Pkt. 7.3.1. beschrieben; im Unterschied dazu extrahierte man anstatt im Scheidetrichter in Zentrifugengläschen und trennte die Phasen durch Zentrifugation. Restwasser wurde durch Filtration über Faltenfilter (Zellulose) abgetrennt.

7.4. Reinigung der Bilindme

7.4.1. Vorreinigung auf selbstgestrichenen Platten (Kieselgel G)

Präparative Ansätze wurden normalerweise über Kieselgel G-Platten (20 x 20 cm², vgl. Pkt. 6.3.) vorgereinigt. Als Referenz trug man seitlich authentischen PCBdme punktförmig auf und entwickelte im Fließmittel TE.

7.4.2. Reinigung auf HPTLC-Platten (Kieselgel G)

Bei Ansätzen mit PC < 0,5 g unterblieb wegen des großen Ausbeuteverlustes die Vorreinigung auf selbstgestrichenen Platten. Die (vorgereinigten) Biline wurden im Fließmittel TE auf HPTLC-Platten (vgl. Pkt. 6.3) chromatographiert, als Referenz diente PCBdme. Nach der Elution (vgl. Pkt. 7.4.3.) wurden die Bilindme auf HPTLC-Platten im Fließmittel A rechromatographiert. Von einem Aliquot der eluierten Chromophore wurde in saurem Methanol ein UV-VIS-Spektrum von 340 nm - 700 nm resp. 800 nm aufgenommen. Ein weiteres Aliquot wurde analytisch chromatographiert (FA bzw. TE). Normalerweise waren die Bilindme nach den oben beschriebenen Chromatographieschritten spektroskopisch und chromatographisch rein. Vor jedem weiteren Schritt wurden die Bilindme auf spektroskopische und chromatographische Reinheit geprüft und gegebenenfalls rechromatographiert.

7.4.3. Elution der Bilindme

Die wie PCBdme wandernde Zone bzw. eine höher chromatographierende, blauviolett bis lila gefärbte Zone (hRF in TE = 72; HCl-PCBdme) wurde herausgekratzt und das Kieselgel in einen acetonefeuchten Faltenfilter geschüttet. Die Bilindme wurden mit Aceton quantitativ eluiert, das Filtrat erneut gefiltert (acetonefeuchter Faltenfilter) und anschließend - je nach Volumen - mit Stickstoff oder am Rotationsverdampfer zur Trockene gebracht.

7.4.4. Chromatographische Eigenschaften der isolierten Bilindme und UV-VIS-Daten

Die hRF-Werte der gereinigten Bilindme wurden durch analytische DC in dem jeweiligen Fließmittel (vgl. Tab. 5) bestimmt. Die hRF-Werte sind Durchschnittswerte aus mehreren unabhängigen DC-Läufen. In der folgenden Tabelle sind die hRF-Werte aller in dieser Arbeit beschriebenen Bilindme sowie die Absorptionsmaxima im jeweiligen Lösungsmittel angegeben. Wie die hRF-Werte sind auch die Absorptionsmaxima Durchschnittswerte aus mehreren Versuchen.

Tab.: 5

UV-VIS-Daten und hRF-Werte verschiedener Bilindme

Bilin	hRF		Absorptionsmaxima nm		
	TE	A	saures Methanol	neutrales Methanol	neutrales Chloroform
E-PCBdme	64	54	690/380	625/369	600/365
Z-PCBdme	72	56	680/370	—	—
grüne Bande	69	57	685/360	—	648/370
R-Cl-PCBdme	64	54	655/370	—	—
S-Cl-PCBdme	80	66	648/340	592/340	585/340
S-Br-PCBdme	80		644/ ?	—	590/ ?
R-Ethylthio-PCBdme	74	67	648/348	—	—
S-Ethylthio-PCBdme	79	69	638/348	—	—
-Hydroxyethylthio-PCBdme ¹	32-35		644/348	—	—

1) Eine Trennung der beiden Diastereomere war nicht möglich.

7.5. Chromsäure- und Chromatabbau von HCl-PCBdme

7.5.1. Analytischer Chromsäureabbau auf der Platte

In wenig Aceton gelöster Bilindme wurde punktförmig auf eine HPTLC-Platte pipettiert; der erhaltene Fleck war dabei von tiefblauer, fast schwarzer Färbung. Nach dem Antrocknen wurde Chromsäure (4 g CrO_3 /100 ml 4 N H_2SO_4) auf den Fleck aufgebracht und nach 15' Trocknen bei RT mehrmals mit Aceton vorchromatographiert (vgl. Pkt. 6.3.3.). Chromsäureabbauten von HCl-PCBdme (hRF in TE = 72) bzw. PCBdme (hRF = 64 in TE) sowie Methanol-Codme (hRF = 64 in TE) wurden sowohl in TEC (oder CEC) als auch in BDE entwickelt. Als Referenz diente immer PCBdme (= innerer Standard).

7.5.2. Präparativer Chromsäureabbau im Reagenzglas

Die für den Abbau von HCl-PCBdme und PCBdme beschriebene Arbeitsweise gilt auch für den Abbau anderer Chromophore (analytisch bzw. zur Darstellung von Referenzimiden).

Ca. 5 ml Bilindme-Lösung in Aceton ($E_{\text{max}}^{\text{VIS}}$ ca. 3) wurde bis zum völligen Verschwinden der ursprünglichen Farbe mit Chromsäure (2 g CrO_3 in 100 ml 2 N H_2SO_4) tropfenweise versetzt und 1 h bei 20°C inkubiert. Man extrahierte 3 mal mit insgesamt 7 ml Essigsäureethylester und wusch diesen mit dest. Wasser farblos. Die Essigsäureethylesterphase wurde zentrifugiert (TZ, 5', 8 000 Upm), über Zellulosefaltenfilter von Wasser befreit und mit Stickstoff abgeblasen.

7.5.2.1. Reinigung der durch Chromsäureabbau erzeugten Imide

Die Imide wurden auf selbstgestrichenen Platten¹ (Kieselgel G mit Fluoreszenzindikator, vgl. Pkt. 6.3.1.) im jeweiligen System chromatographiert. Die Imide von PCBdme und HCl-PCBdme wurden zuerst im Fließmittel TEC, dann - nach Elution - im Fließmittel BDE chromatographiert. Zonen bei denen im UV-Licht die Fluoreszenz gequenchet wurde, wurden herausgekratzt und mit einem

¹ Bei geringer Konzentration unterblieb die Vorreinigung auf selbstgestrichenen Platten; die Reinigung erfolgte präparativ auf HPTLC-Platten ohne Fluoreszenzindikator

Überschuß Aceton eluiert. Die Imide wurden nach Konzentration mit Stickstoff auf HPTLC-Platten (Kieselgel G ohne Fluoreszenz-indikator) im jeweiligen Fließmittel (TEC für die Imide aus HCl-PCBdme und PCBdme) präparativ chromatographiert. Nach dem Besprühen eines Teststreifens¹ mit Tetramethylbenzidin (7.5.4.1.) wurden die korrespondierenden Zonen mit Aceton eluiert. Die Lösung wurde abgefiltert und mit Stickstoff eingeblasen. Die Reinheitsüberprüfung sowie die Bestimmung der RF-Werte erfolgte durch erneute analytische Chromatographie, bei bekannten Imiden mit authentischen Imiden, sonst mit E-MAES, HSE und MEM als Standard auf HPTLC-Platten.

7.5.2.2. Ergebnisse des Chromsäureabbaus von HCl-PCBdme

Der Chromsäureabbau von E-PCBdme liefert 3 Imide mit den folgenden hRF-Werten: MEM (BDE: 57 ; TEC 70), HSE (BDE 60; TEC 53) und E-MAES (BDE 45; TEC 41). Der Chromsäureabbau von HCl-PCBdme liefert ebenfalls 3 Imide; die beiden hoch chromatographierenden Imide wurden durch Mischchromatographie als MEM und HSE identifiziert. Das Imid mit hRF 48 in TEC wurde durch Mischchromatographie mit β^* -MGLS im System TEC und BDE (hRF 55) als S-MGLS identifiziert. Der Chromsäureabbau von in TE gereinigtem Methanol-Co lieferte MEM, HSE und E-MAES.

7.5.3. Chromatabbau von HCl-PCBdme

In Aceton gelöster HCl-PCBdme bzw. Coprobiliverdintetramethylester (für den ich Frau E. Benedikt herzlich danken möchte) wurden punktförmig auf eine HPTLC-Platte pipettiert. Nach dem

¹ Der Teststreifen wurde vorher mit einem Glasschneider abgetrennt.

Antrocknen der Flecke wurde das Abbaureagenz (1% Kaliumdichromat + 1% Kaliumhydrogensulfat in dest. H_2O , pH 1,7) auf die Flecke aufgetragen. Nach 1/2 h Reaktionsdauer wurde im System TEC entwickelt. Bei HCl-PCBdme und Coprobiliverdin ließ sich MPD (hRF 53) als einziger Pyrroldialdehyd nachweisen.

7.5.4. Visualisierung der Imide

7.5.4.1. Visualisierung mit Tetramethylbenzidin

Sprühreagenz: 300 mg Tetramethylbenzidin in 100 ml 50% wässrigen Ethanol.

Die Platten wurden 5' in einer Chlorkammer ($KMnO_4$ + HCl konz.) inkubiert und anschließend im Luftstrom überschüssiges Chlor verjagt. Bei Besprühen mit Tetramethylbenzidin ergeben die Imide in niedrigen Konzentrationen blaue Flecke auf weißem Grund, in höheren Konzentrationen gelbe Flecke mit zunehmender rötlicher Tönung.

7.5.4.2. Visualisierung mit Kaliumpermanganat

Sprühreagens: 0,1 M $KMnO_4$ in H_2O dest.

Die Platten wurden ohne Vorbehandlung mit dem Sprühreagenz besprüht. Maleinimide lassen sich durch sofortige Gelbfärbung vor leicht rötlichem Hintergrund von Succinimiden unterscheiden.

7.5.4.3. Visualisierung mit UV-Licht

Auf Platten mit in die Kieselgelschicht integriertem Fluoreszenzindikator erscheinen Imide unter UV-Licht als schwarze Flecke.

Auf Platten ohne Fluoreszenzindikator zeigen. Imide mit konjugierter Doppelbindung (i.e. MVM) eine gelblich-weiße Fluoreszenz. Nach Visualisierung mit UV-Licht wurden die Platten in der Regel mit Tetramethylbenzidin besprüht, um die Imidspezifische Farbreaktion mit der Fluoreszenz bzw. ihrem Quenchen zu korrelieren.

7.5.5. Visualisierung der Pyrroldialdehyde

Die Visualisierung erfolgte durch Besprühen mit 0,2 % 2,3-Dinitrophenylhydrazin in 50% wässrigem Methanol (2 N an H_2SO_4). Pyrroldialdehyde erscheinen als blaue Flecke.

7.6. Darstellung von Referenzimiden

7.6.1. Interner Standard

Bei analytischen Chromsäureabbauten auf der Platte diente in der Regel ein auf der Platte abgebauter PCBdme (E-konfiguriert) als interner Standard für die Imide E-M Δ ES, MEM, HSE und HS.

7.6.2. Methylvinylmaleinimid (= MVM)

Bilirubin (Serva, f. biochem. Zwecke) wurde in konz. NH_3 gelöst, mit HCl konz. gefällt und abzentrifugiert (TZ, 5', 10000 Upm). Der Niederschlag wurde mit Chromsäure präparativ abgebaut (vgl. Pkt. 7.5.2) und in TEC chromatographiert. MVM wurde mit UV-Licht visualisiert, mit Essigsäureethylester eluiert und im gleichen System rechromatographiert. Die Überprüfung der Reinheit erfolgte durch vergleichende Visualisierung mit UV-Licht und Tetramethylbenzidin.

7.6.3. Hämatinsäuremethylester, Methylethylmaleinimid und Methylethylidensuccinimid

Veresterter PCBdme-Rohextrakt (methanolytische Darstellung) wurde präparativ mit Chromsäure abgebaut und gereinigt. (vgl. Pkt. 7.5.2.). Reinigung und Analyse erfolgte im Vergleich mit analytisch abgebautem, reinen PCBdme im System TEC.

7.6.4. Präparation der diastereomeren 2(1-Chlorethyl)-3-methyl-succinimide = α -Chlorsuccinimide

Präparation erfolgte nach Klein, G. 1977. Frau Dr. S. Schoch danke ich herzlich für die Überlassung von 2-(-1-Hydroxy-ethyl)-3-methyl-succinimid (α -Hydroxy-succinimid) und authentischen α -Chlorsuccinimiden als Vergleichsmaterial.

0,013 Mol α -Hydroxysuccinimid (2 g) in 12 ml CHCl_3 und 1,3 ml Pyridin wurden mit 2 ml Thionylchlorid (ca. 0,025 Mol) versetzt (Eiskühlung). Nach 2 tägiger Inkubation bei RT wurde eingengt, in CHCl_3 aufgenommen, mit 50% Na_2CO_3 -Lösung und anschließend H_2O dest. gewaschen. Die Lösung wurde über Zellulose gefiltert und auf 1/3 des Ausgangsvolumens eingengt. Nach einigen Stunden bilden sich nadelförmige Kristalle in einer öligen Substanz. Die Reinigung der Imide erfolgte auf selbstgestrichenen Platten (Kieselgel G mit Fluoreszenzindikator) im System BDE sowie TEC. Analyse erfolgte auf HPTLC-Platten ebenfalls in beiden Systemen.

7.7. Ausschluß einer Doppelbindung im Imid hRF 48

HCl-PCBdme (analytisch r.) wurde mit Chromsäure präparativ abgebaut (Pkt. 7.5.2.). Die in Essigester extrahierten Imide wurden in verschiedenen Konzentrationen rechts und links einer vorher markierten Mittellinie auf HPTLC-Platten aufgetragen. Die Konzentration war auf der linken Seite um den Faktor 5 höher. Die Nach Entwicklung in TEC wurde die rechte Seite mit Parafilm abgedichtet, die linke Seite mit KMnO_4 (1%) besprüht. Dann wurde die Platte nach Inkubation in der Chlorkammer (Verstärkung der KMnO_4 -Farbreaktion) links abgedeckt und mit Tetramethylbenzidin besprüht. KMnO_4 -positive Reaktion zeigte MEM und HSE, nicht Imid 48.

7.8. Eliminationsreaktionen der diastereomeren α -Chlorsuccinimide und des Imids mit hRF 48

7.8.1. Präparative Eliminierung mit Ammoniak

Reinigung des Imides mit hRF 48: Chromsäureabbau von HCl-PCBdme und Reinigung des Imids mit hRF 48 (TEC) vgl. 7.5.2./7.5.2.1.

Reinigung der diastereomeren α -Chlorsuccinimide: erfolgte analog.

α^* - bzw. β^* -konfiguriertes α -Chlorsuccinimid sowie Imid hRF 48 wurde in ammoniakalischem Methanol (25 % NH_3 : MeOH = 1 : 10) aufgenommen und die Reaktionsmischung nach 1 h Inkubation bei 20° C mit dem doppelten Volumen Essigsäureethylester extrahiert.

Nach 1maligem Waschen mit dem gleichen Volumen dest. Wassers wurde die von Wasser befreite Lösung (Filtration über Zellose) mit Stickstoff eingeeengt und die Imide dünnschichtchromatographisch analysiert. (HPTLC-Platten; Entwicklung im System TEC bzw. BDE). Als Referenz dienten die Ausgangsimide, R- bzw. S-konfiguriertes α -Chlorsuccinimid bzw. Imid hRF 48 sowie Z- und E-konfiguriertes MΔES.

Die Eliminierung in wässrigem Ammoniak ($25\% \text{NH}_3/\text{H}_2\text{O} : 1 : 10$) und die Extraktion bzw. Analyse der Imide erfolgte analog. $\alpha^*\text{-ClS}$ (BDE 51; TEC 41) eliminiert quantitativ zu E-MΔES (BDE 45; TEC 41; $\beta^*\text{-ClS}$ (TEC 48; BDE 55) und Imid hRF 48 (TEC 48; BDE 55) eliminieren zu Z-MΔES (TEC 47; BDE 51. Die Identifizierung der Eliminierungsprodukte erfolgte durch Cochromatographie mit authentischen Imiden.

7.8.2. Analytische Eliminierung mit Ammoniak-Gas

Das zu untersuchende Imid (authentische α -Chlorsuccinimide bzw. Imid hRF 48) wurde punktförmig auf eine HPTLC-Platte pipettiert und für 5' in eine NH_3 -Atmosphäre eingebracht. Nach dem Verjagen des überschüssigen NH_3 (ca. 20' im Abzug) wurde im Fließmittel BDE chromatographiert. Bei der Visualisierung der Imide ist wichtig, daß die Tetramethylbenzidinlösung kein KJ enthält, da sonst eine zu starke Hintergrundfärbung auftritt.

7,9 FAB-Massenspektrum von S-konfiguriertem α -Chlor-PCBdme

FAB-Massenspektren wurden am Max-Planck-Institut für Biochemie von Herrn Prof. D. W. Schäfer aufgenommen.

7.10. Identifikation von Methanol-Co als R-konfiguriertes
 α -Chlor-PCB

Chromatographische Reinigung, Aufnahme der Spektren und
Chromsäureabbau

HCl-Rohextrakt dme (Abspaltung und Veresterung vgl. Pkts. 7.2. 2.2./7.3.2, ausgehend von DEAE-gereinigtem PC) wurde entweder in Fließmittel A oder Fließmittel TE mit authentischem PCB dme (6.1) cochromatographiert. Zur präparativen Reinigung erfolgte die DC zuerst auf selbstgestrichenen, dann auf HPTLC-Platten in ausschließlich einem Fließmittel, TE oder A. Die mit authentischem PCB dme cochromatographierende Zone (Fließmittel A oder TE) wurde eluiert und ein UV-VIS-Spektrum eines Aliquots in saurem Methanol aufgenommen. Das durch Chromatographie in TE erhaltene Pigment wurde in TE rechromatographiert und erneut ein Spektrum aufgenommen. Je ein Aliquot der in Fließmittel A oder TE gereinigten Methanol-Co-Pigment dme wurde analytisch mit Chromsäure abgebaut (7.5.1) und die Imide in Fließmittel TEC und BDE analysiert. Als Referenzimide diente E-M4ES, Z-M4ES sowie α^* - und β^* -konfiguriertes α -Chlorsuccinimid. Die Elimination von HCl durch ammoniakalkalisches Methanol erfolgte analog Pkt. 7.8. die DC wurde auf HPTLC-Platten in den Systemen BDE sowie TEC mit α^* -konfiguriertem Succinimid und Z/E-M4ES durchgeführt.

In FA gereinigtes Methanol-Co liefert die Imide MEM, HSE (hRF s. Tab. 1), sowie 2 Imide mit hRF (BDE 51; TEC 41) und hRF BDE 45, TEC 41 im Verhältnis 10 : 1. Das Imid mit hRF 51 in BDE wurde durch Cochromatographie und Eliminierungsversuche mit Ammoniak als R-MCIS identifiziert. Das Imid eliminiert zu E-M4ES nach Behandlung mit methanolischem Ammoniak bzw. nach "analytischer Eliminierung". In TE gereinigtes Methanol-Co liefert die Imide MEM, HSE und E-M4ES. Bei einmaliger Reinigung im Fließmittel TE tritt zusätzlich R-MCIS auf, das zu E-M4ES im Verhältnis 1 : 10 steht.

7.11. Abschätzung der Mengenverhältnisse der diastereomeren α -Chlorchromophore

HCl-Rohextrakt dme (vgl. Pkts. 7.2.2.2./7.3.2.) wurde präparativ auf HPTLC-Platten in Fließmittel A gereinigt. Eine Platte wurde densitometrisch im Durchlicht (Filter 598 nm) gescannt, die Peaks semiautomatisch integriert.

Nach der Chromatographie eines HCl-Rohextrakt dme (siehe oben), wurden die Zonen mit hRF 66 ((S)-Chlor-PCBdme) und hRF 54 ((R)-Chlor-PCBdme) herausgekratzt. Die Bilindmes wurden mit Aceton quantitativ eluiert und das Lösungsmittel mit Stickstoff abgeblasen. Man löste den trockenen Rückstand in 2.0 ml saurem Methanol und nahm ein Spektrum von 300 nm - 800 nm auf. Die Extinktion bei 655 nm (= 0,49; R-konfiguriert) bzw. 648 nm (= 0,19; S-konfiguriert) wurde zur Basis 480 nm - 780 nm in Extinktionseinheiten bestimmt.

7.12. Addition von HCl an E-PCBdme

E-PCBdme $E_{\max}$ 688 nm, 384 nm, chromatographisch rein) wurde bei RT mit 12 N HCl p.A. inkubiert ($E_{660 \text{ nm}}$ ca. 0.8, Dunkelprobe); von einem Aliquot (= Meßprobe) im Spektrophotometer alle 10' ein Spektrum von 340 nm - 700 nm aufgenommen wurde. Nach 1 h Reaktionsdauer wurde von der Dunkelprobe ebenfalls ein Spektrum (340 nm - 700 nm) aufgenommen, das sich bis auf die etwas schwächere Ausprägung der Schulter bei 600 nm nicht von der Meßprobe unterschied. Die Dunkelprobe wurde analog Pkt. 7.2.2.2. extrahiert und verestert (7.3.2.). ($E_{\text{saures Methanol}}$: 658 nm/354 nm)
Als Referenz 1 diente E-PCBdme (siehe oben), das wie die Dunkelprobe "verestert" wurde. Als Referenz 2 diente ein parallel hergestellter HCl-Rohextrakt dme (vgl. Pkt. 7.2.2.2./7.3.2.)
(Referenz 1 $E_{\text{saures Methanol}} = E_{\text{PCB}} = 688 \text{ nm}/384 \text{ nm}$;
Referenz 2 $E_{\text{saures Methanol}} = 652 \text{ nm}/352 \text{ nm}$).

Die Cochromatographie des Additionsansatzes mit E-PCBdme und einem HCl-Rohextrakt in Fließmittel A zeigte, das S- und R-konfiguriertes Chlor-PCBdme entstanden war. (hRF s. Tab. 5) Der Chromsäureabbau des Additionsansatzes ergab drei Imide, die durch Cochromatographie mit R- und S-konfiguriertem α -Chlorsuccinimid in BDE (hRF vgl. Tab. 1) identifiziert wurden. (Für den analytischen Chromsäureabbau vgl. 7.5.1.)

7.13. Chromsäureabbau eines HCl-ROHextraktdme

Der Chromsäureabbau von HCl-PCBdme-Rohextrakt (vgl. Pkts. 7.2.2.2./7.3.2.) erfolgte im Glas (7.5.2.); die Imide wurden sowohl im System TEC als auch BDE auf HPTLC-Platten chromatographiert. Ein Aliquot der in Essigester extrahierten Gesamtimide wurde in ammoniakalischem MeOH (vgl. Pkt. 7.8.1.) inkubiert und die Reaktionsprodukte erneut chromatographiert (HPTLC-Platten, Systeme TEC bzw. BDE). Als Referenz diente jeweils ein Chromsäureabbau (7.5.2.) von (S)-Chlor-PCBdme sowie E-PCBdme.

Der Chromsäureabbau des Rohextraktes liefert ausschließlich MEM, HSE und die S- bzw. R-konfigurierten α -Chlorsuccinimide.

7.14. Sorbenskatalysierte Umlagerung der diastereomeren Chlor-PCBdme zu den Ethyliden-PCBdme.

7.14.1. Beweise für die sorbenskatalysierte Umwandlung

a) spektrale Untersuchungen

Ein Aliquot eines HCl-Rohextraktdme (DEAE-PC; vgl. Pkts. 7.2.2.2./7.3.2) wurde in saurem Methanol gelöst und ein UV-VIS-Spektrum von 340 nm - 700 nm (Empfindlichkeit 0-1) aufgezeichnet. Je die Hälfte des Rohextraktdmes wurde strichförmig auf eine HPTLC-Platte aufgetragen und entweder in FA oder TE chromatographiert. Die gesamte Kieselgelschicht der Platte wurde abgeschabt und die Biline mit Aceton quantitativ eluiert. Nach dem Abblasen des Acetons mit Stickstoff löste man den Bilindme-Rückstand in saurem Methanol und nahm wie oben ein Spektrum auf.

b) 2-dimensionale Platte

Ein HCl-Rohextrakt (7.2.2.1./7.3.1.) wurde punktförmig auf eine HPTLC-Platte aufgebracht. Nach Vorlauf in Aceton wurde in Fließmittel TE entwickelt, das Fließmittel verdunstet, die Platte senkrecht zur 1. Dimension mit Aceton vorchromatographiert und erneut in TE entwickelt.

7.14.2. Nachweis der spezifischen Umlagerungsprodukte

7.14.2.1. Versuch der Eliminierung mit verdünntem Ammoniak

(S)-Chlor-PCBdme und (R)-Chlor-PCBdme wurden in 1.3 N wässrigen oder methanolischem Ammoniak für maximal 3 h inubiert (RT, Lichtschutz), die Bilindme anschließend in CHCl_3 extrahiert. Die Extraktion aus dem wässrigen Ammoniak erfolgte analog Pkt. 7.2.2.2. (Extraktion der Bilindme aus Salzsäure); aus dem methanolischen Ammoniak wurde extrahiert, indem man CHCl_3 und anschließend Eiswasser (dest.) bis zur Phasentrennung zugab. Die Aufarbeitung der Chloroformphasen erfolgte analog Pkt. 7.2.2.2.. Von einem Aliquot wurde ein Spektrum in saurem Methanol aufgenommen (340 nm - 700 nm); das andere Aliquot wurde analytisch auf der Platte mit Chromsäure (7.5.1.) abgebaut. Entwickelt wurde im Fließmittel BDE mit Chromsäureabbauten (7.5.1.) von E-PCBdme, S-Chlor-PCBdme und R-Chlor-PCBdme als Referenz.

7.14.2.2. "Präparative" sorbenskatalysierte Eliminierung auf Kieselgel-G-HPTLC-Platten

Ein HCl-Rohextrakt (7.2.2.1./7.3.1.) ohne nachweisbaren Chlorophyllgehalt wurde in Fließmittel A auf HPTLC-Platten 1 x präparativ chromatographiert. Die S-Chlor-PCBdme und die Methanol-Codme-Zone wurden herausgekratzt, die Bilindme mit Aceton vom Kieselgel eluiert. Das Aceton wurde mit Stickstoff abgeblasen und von einem Aliquot UV-VIS-Spektren von 340 nm - 700 nm aufgenommen. Ein Aliquot wurde jeweils mit Chromsäure im Glas (7.5.2.) abgebaut. Ein anderes Aliquot der in FA gereinigten Bilindme wurde präparativ in Fließmittel TE rechromatographiert (Referenz: HCl-Rohextrakt, s.o.). Die Bilindme, die dem S-Chlor-PCBdme bzw. dem Methanol-Codme korrespondierten wur-

den isoliert und wie oben analysiert. (Spektrum in saurem Methanol von 340 nm - 700 nm; Chromsäureabbau). Die Imide aller Proben wurden sowohl in TEC als auch in BDE entwickelt; als Referenz diente zusätzlich α^* - und β^* -Chlor-Succinimid sowie E- und Z-MAES.

7.14.2.3. Nachweis von Z-PCBdme als Umlagerungsprodukt von (S)-Chlor-PCBdme

HCl-PCBdme-Rohextrakt (/2.2.1./7.3.1.) wurde in TE präparativ chromatographiert (HPTLC-Platten) und die in der "Schmierzone" (zwischen (S)-Chlor-PCBdme und E-PCBdme) wandernden Bilindme isoliert. Der Acetonextrakt wurde mit Stickstoff etwas eingengt und im System TE sowohl analytisch als auch präparativ rechromatographiert (Referenz: (S)-Chlor-PCBdme, Z- und E-PCBdme, Cochromatographie des Acetonrohextrakts mit dem letzteren). Die Zonen, die dem (S)-Chlor-PCBdme, dem Z-PCBdme sowie dem E-PCBdme entsprachen, wurden herausgekratzt und die Bilindme mit Aceton eluiert. Das Aceton wurde mit Stickstoff abgeblasen und UV-VIS-Spektren in saurem Methanol, neutralem Methanol sowie saurem Chloroform, jeweils von 340 nm - 800 nm aufgenommen. Als Referenz diente authentisches Z-PCBdme (Rüdiger, W. et al. 1980). Die Werte sind in der Tabelle 5 aufgeführt:

Pigment	Absorptionsmaxima	
	saures Methanol	Chloroform
E-PCBdme	690/378-380	600/365
Z-PCBdme	680/370	
S-Chlor-PCBdme	645/340	585/340
R-Chlor-PCBdme	655/374	
Methanol-Co chrom. in TE	685-690/378	
Methanol-Co chrom. in FA	655/374	
HCl-Rohextrakt- dme	650/350	

Tabelle 5:

Ein Aliquot wurde in der DC auf seine Homogenität im System TE untersucht; ein weiteres Aliquot der Bilindme wurde analytisch mit Chromsäure (7.5.1.) abgebaut und in den Systemen BDE bzw. TEC analysiert. (Referenz: Chromsäureabbau von Z- und E-PCBdme).

7.15. Versuchte Identifikation eines weiteren, grüngefärbten Gallenfarbstoffdme

7.15.1. Oxidative Aufarbeitung eines HCl-Rohextraktes

Der Chromophor des PC wurde durch 1 h Inkubation in HCl konz. bei RT unter magnetischem Rühren abgespalten. Nach dem Verdünnen mit Eiswasser wurde von denaturiertem Protein abgefiltert und die Biline quantitativ in Butanol extrahiert. Neutralisation und Trocknung der Butanolphase erfolgte analog 7.2.2.1. Das Butanol wurde bei 60° C am Rotationsverdampfer eingengt, wobei die blaue Farbe nach grün umschlägt, der Rückstand mehrmals in Butanol aufgenommen und am Rotationsverdampfer wieder eingengt. Die Veresterung erfolgte analog Pkt. 7.3.1., analytische DC erfolgte im System TE und FA mit HCl-Rohextrakt dme (7.2.2.1./7.3.1.) als Referenz. Präparativ wurde der grüne Bilindme (hRF 70) im Fließmittel TE auf selbstgestrichenen Platten gereinigt. UV-VIS-Spektren wurden in saurem Methanol (360 nm/685 nm) und neutralem Chloroform (370 nm/648 nm) aufgenommen; FAB-Massenspektren (Molekülpeak bei 649; 651/652) gemäß Pkt. 7.9.. Analytischer Chromsäureabbau erfolgte nach Pkt. 7.5.1., die Entwicklung in TEC mit MEM, HSE und bromierten Maleinimiden als Referenz. (7.15.2.).

7.15.2. Darstellung von α -Brom-Maleinimid/ α -Methoxy-maleinimid

1 g in Tyndall-Reaktionsgefäße eingebrachtes Biliverdin/Bilirubin wurde bei 40° C unter magnetischem Rühren mit 20 ml HBr-Eisessig (40 % HBr) versetzt; nach 1 h entfernte man HBr-Eisessig über Siedesteinchen im Wasserstrahlvakuum. Verestert wurde nach Pkt 7.3.1.; die Imide (analytischer Chromsäureabbau nach 7.5.1.) entwickelte man im System TEC. Ein Aliquot des unveresterten Rückstandes an Brom-Bilin wurde in 10 ml KOH (1,2 g KOH in 10 ml MeOH) aufgenommen und nach 10' von KBr abgefiltert, der KBr-Niederschlag mit MeOH nachgewaschen und das Filtrat mit H₂SO₄/MeOH (6%, w/w) angesäuert (Eiswasser!). Nach Extraktion in CHCl₃ wurden die Methoxy-Biline verestert

(7.3.1.) und analytisch mit Chromsäure abgebaut (7.5.1.); die Chromatographie der Imide erfolgte im System TEC mit Chromsäureabbau von Biliverdindme (Veresterung nach 7.3.1.) bzw. Br-Bilindme als Referenz.

7.16. Abspaltung des Phycocyaninchromophors mit gasförmigem HCl bzw. HBr

Die Abspaltung erfolgte nach Rüdiger, W. et al., 1980. PC (DEAE-gereinigt) wurde in TFA gelöst ($E_{\max}$ ca. 2) und 10' unter Rückfluß mit N_2 gespült. Anschließend wurde 10' HBr bzw. 60' HCl-Gas eingeleitet, wobei letzteres über P_2O_5 getrocknet wurde. Nach 10' Spülen mit N_2 engte man zur Trockene ein. Der Rückstand wurde in MeOH gelöst und durch Zusatz von H_2SO_4 /MeOH (6% H_2SO_4 /MeOH : MeOH = 1 : 1) verestert. Die Aufarbeitung der DME erfolgte lt. 7.3.2..

Die Analyse der Pigmentdme erfolgte dünnschichtchromatographisch (HCl-PCBdme in FA; HBr-PCBdme in TES); durch analytischen Chromsäureabbau sowohl der gereinigten Halogen-Bilindme als auch der Rohextrakte.

Spektren wurden in saurem Methanol (HBr-PCBdme = 640 nm/340 nm) und neutralem Chloroform (HBr-PCBdme = 590 nm/340 nm) aufgenommen. Ein Rohextrakt von HBr-PCB (unverestert) wurde zusätzlich in Methanol aufgenommen und die Biline in $CHCl_3$ extrahiert. Nach der vollständigen Neutralisation der $CHCl_3$ -Phase wurde das Lösungsmittel abgeblasen und die Biline in saurem Methanol aufgenommen. Das UV-VIS-Spektrum der Biline wurde von 300 nm - 800 nm (Empfindlichkeit 0 - 1,5) aufgezeichnet, die zweite Ableitung dieses Spektrums wurde bei einem Punktabstand von 10 nm (Empfindlichkeit -0,5 - 0,5) aufgenommen.

7.17. Untersuchung des Apoproteins

Die Abspaltung des Chromophors erfolgte nach Pkt. 7.2.2.2., das Protein durch Zugabe von Eiswasser/ CHCl_3 = 4 : 1 ausgefällt und der Ansatz zentrifugiert. Der an der Phasengrenze ausgefallene Proteinkuchen wurde in HCl konz. gelöst. Die Lösung wurde in Eiswasser mit 10 ml merkaptoethanolhaltigem Wasser (20 ml H_2O , 1 ml Merkaptoethanol) versetzt und bis zur neutralen Reaktion des Dialysewassers gegen merkaptoethanolhaltiges Wasser (300 ml H_2O , 150 μl Merkaptoethanol) dialysiert. Das Dialysat zentrifugierte man (TZ, 10 000 Upm, 20', RT) und testete den Überstand in einer SDS-Elektrophorese.

7.17.1. SDS-Elektrophorese des Apoproteins

Die Modalitäten der SDS-Elektrophorese sind der Diplomarbeit zu entnehmen (Sepp, E. 1981). SDS 10%; Sammelgel (3% Acrylamid, pH 6,8) Trenngel: (pH 8,8; kontinuierlicher Gradient von 5 - 25 % Acrylamid.) Als Proteintestmischung wurde eine 1:1:1:1-Mischung folgender Proteine verwendet: Cytochrom C (MG 12 300), Rinder-serumalbumin (MG 68 000), Myoglobin (MG 17 000), Chymotrypsinogen (MG 25 000).

8. Darstellung von PCBdme-Thioethern

8.1. Versuchte Substitution von α -Brom-PCBdme mit Sulfid

α -Brom-PCBdme (7.16.) wurde zu 7 ml alkalischer Sulfidlösung (4,8 g KOH in 40 ml H_2O dest. gesättigt mit H_2S) gegeben und 1 h H_2S eingeleitet. Die Reaktionsmischung kühlte man im Eisbad, säuerte mit $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{MeOH}$ (6% H_2SO_4) bis zum Farbumschlag gelb/blau an und extrahierte die Bilindme in CHCl_3 . Die Aufarbeitung erfolgte wie üblich. DC der DME führte man in den Systemen TE bzw. FA durch; die Imide (analytischer Chromsäureabbau nach Pkt. 7.5.1.) wurden in BDE chromatographiert.

8.2. Addition von SH-Verbindungen an PCBdme

Die Darstellung von Thioether-PCBdme erfolgte in gasdicht schließenden Derivatisierungsgefäßen im Dunklen.

8.2.1. Addition von Ethylmerkaptan an PCBdme

Ansatz in ammoniakalischem Methanol

PCBdme (Methanolyseprodukt) wurde in 20 ml NH_3/MeOH (1 ml 25% NH_3 + 20 ml MeOH) gelöst ($E_{600} = 1.04$) und mit 12 ml Ethylmerkaptan versetzt. Die Probe wurde bei RT 2,25 h inkubiert. Spektren wurden sofort nach Zusatz von Ethylmerkaptan bzw. nach 2,25 h in der Reaktionsmischung aufgenommen. Als Nullprobe wurde PCBdme wie oben, jedoch ohne Merkaptoethanol-Zusatz, behandelt.

Ansatz in saurem Methanol

PCBdme wurde in saurem Methanol (20 ml MeOH, 250 μl TFA) und 12 ml Ethylmerkaptan wie oben inkubiert.

Extraktion der Bilindme

Die Ansätze wurden in Eiswasser gekühlt, mit geeistem CHCl_3 versetzt und Eiswasser langsam zugegeben. Die CHCl_3 -Phase (gelb bei alkalischem Ansatz mit Ethylmerkaptan, blau bei der Nullprobe bzw. bei dem sauren Ansatz) wurde durch Waschen mit Eiswasser (dest.) neutralisiert (pH-Papier) und durch Filtern über Zellulose vom Restwasser befreit. CHCl_3 wurde mit N_2 abgeblasen, der Rückstand (blau bzw. gelbgrün) in 6% $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{MeOH}$ aufgenommen und die Biline erneut in CHCl_3 extrahiert. Nach Neutralisation der CHCl_3 -Phase durch Waschen mit Eiswasser (dest.) wurde das Lösungsmittel mit N_2 abgeblasen.

8.2.2. Chromatographie der Ethylmerkaptan-PCBdme

Analytische Chromatographie erfolgte in den Systemen TE und FA mit PCBdme als Referenz. Präparative Chromatographie wurde in TE durchgeführt. Isoliert wurden die Bilindme mit hRF 79 und 74 und bei Bedarf im gleichen System rechromatographiert. Das Bilin mit hRF 74 wurde für analytische Zwecke nur dann eingesetzt, wenn die Beimengung an Bilin hRF 79 weniger als 10% betrug.

8.2.3. UV-VIS-Spektren der Bilindme mit hRF 79 bzw. 74

UV-VIS-Spektren der Pigmentgemische bzw. der gereinigten Bilindme mit hRF 74 bzw. 79 wurden in saurem Methanol von 200 - 800 nm aufgenommen. (vgl. Tabelle 6)

Tabelle 6 :

Absorptionsmaxima der Ethylmerkaptan-PCBdme in saurem Methanol; Schultern im Spektrum sind in Klammern gesetzt.

hRF des Bilins	Absorptionsmaximum (nm)	Extinktion
79	(270) (330) 348 638	0,38 - 0,77 0,84
74	270 (330) 348 648	0,97 - 0,40 0,39

8.2.3. FAB-Spektrum der Bilindme mit hRF 79 bzw. 74

Für die FAB-Spektren vgl. Pkt. 7.9.

8.2.4. Chromsäureabbau der Bilindme mit hRF 79 bzw. 74

8.2.4.1. Darstellung der diastereomeren Sulfonyl-Succinimide und ihre Reinigung

Darstellung und Reinigung der diastereomeren Sulfonylsuccinimide erfolgte wie bei Klein, G. 1977 beschrieben: 17 mg (0,1 mMol) α^* -Chlor-Succinimid wurden in 5 ml MeOH und 3 ml 25% NH_3 gelöst. Nach Zugabe von 0,5 mMol Ethylmerkaptan (3 Tropfen) inkubierte man 3 h bei RT, engte mit N_2 ganz ein und versetzte mit 10 ml Chromsäure (1% $\text{CrO}_3/2 \text{ n H}_2\text{SO}_4$). Nach 1 h bei RT extrahierte man die Imide in Ethylacetat, trocknete dieses durch Filtration über Zellulose und brachte am Rotationsverdampfer zur Trockene. Der Rückstand wurde in Wasser aufgenommen und gefriergetrocknet. Die Reinigung der Imide erfolgte auf selbstgestrichenen Platten (Kieselgel G) im System TEC 2. Die Imide wiesen hRF-Werte von 16 resp. 24 im System TEC 2 auf HPTLC-Platten auf.

8.2.4.2. Chromsäureabbau der Bilindme mit hRF 79 bzw. 74

Chromsäureabbau der Bilindme erfolgte nach Pkt 7.5.2., die Chromatographie der in Essigester extrahierten Imide im System TEC 2 mit den diastereomeren Sulfonylsuccinimiden, MAES sowie den aus einem Chromsäureabbau von PCBdme extrahierten Imiden als Referenz.

8.2.4.3. Inkubation der Bilindme in 6% H_2SO_4 /MeOH

Bilindme mit hRF 79 und Bilindme mit hRF 74 wurden 18 h in 6 % H_2SO_4 /MeOH im Dunklein bei $-19^{\circ}C$ inkubiert. Die Bilindme wurden wie bei einem Veresterungsansatz üblich, in $CHCl_3$ extrahiert und aufgearbeitet. Die Chromatographie der Bilindme erfolgte im System TE mit PCBdme als Referenz, die Konzentration der einzelnen Banden wurde per Augenmaß bestimmt.

8.3. Darstellung von Mercaptoethanol-PCBdme und dessen Eigenschaften

8.3.1. Darstellung von Mercaptoethanol-PCBdme in wässrigem bzw. methanolischem Ammoniak

PCBdme wurde in 1 ml NH_3 /MeOH (1 ml 25% NH_3 ; 20 ml MeOH) gelöst (methanolischer Ansatz) bzw. in 50 μ l MeOH gelöst und mit 1 ml NH_3/H_2O versetzt (wässriger Ansatz). Zu beiden Proben gab man bis zur bleibenden Gelbfärbung je 10 Tropfen Merkaptoethanol. Nach 2,25 h Inkubation im Dunklen bei RT wurden die Bilindme in $CHCl_3$ extrahiert. Dazu wurde die wässrige Probe mit kaltem MeOH/ $CHCl_3$ (= 1:2) versetzt, der methanolische Ansatz zuerst mit eiskaltem $CHCl_3$, dann mit Eiswasser bis zur Phasentrennung. Die weitere Aufarbeitung erfolgte analog der Aufarbeitung der Ethylthio-PCBdme (8.2.1.).

8.3.2. Chromatographie der Bilindme

Die Chromatographie der Bilindme erfolgte analytisch und präparativ im System TEH^+ , als Referenz diente ein Aliquot des eingesetzten PCBdme. Präparativ konnten die beiden Bilindme mit hRF 35

bzw. 32 nicht getrennt werden. Die weiteren Untersuchungen wurden deshalb mit dem Gemisch der beiden Pigmentdme (hRF 32-35) durchgeführt.

8.3.3. UV-VIS-Spektrum der Bilindme

UV-VIS-Spektren der Bilindme (hRF 32-35) wurden in saurem Methanol von 340 - 800 nm aufgenommen: das Gemisch absorbiert bei 644 nm/ 349 nm mit Schultern bei 334 nm und 280 nm, wobei die UV/VIS-Quotient 0,97 beträgt.

8.3.4. FAB-Spektren der Bilindme

Für die FAB-Spektren vergleiche Pkt. 7.9

8.3.5. Chromsäureabbau der Bilindme

Die Bilindme (hRF 32-35) aus dem wässrigen bzw. dem methanolischen Ansatz wurden mit Chromsäure nach Pkt. 7.5.2. abgebaut. Das Imidgemisch wurde mit den diastereomeren Sulfonylsuccinimiden (Pkt. 8.2.4.1.) bzw. dem aus PCBdme durch Chromsäureabbau (7.5.2.) erhaltenen Imiden im System TEC 2 chromatographiert.

8.4. Spaltung der diastereomeren Ethylthio-PCBdme mit HCl

In der DC reiner Ethylthio-PCBdme (hRF 79 = S-konfiguriert; hRF 74 = R-konfiguriert) sowie DEAE-PC wurden in HCl konz. 1 h inkubiert (Pkt. 7.2.2.2.) und verestert (Pkt. 7.3.2.).

UV-VIS-Spektren wurden in saurem Methanol von 340 nm - 700 nm aufgenommen.

Chromatographie der Bilindme erfolgte im System TE mit PCBdme sowie einem Aliquot der eingesetzten diastereomeren Ethylthio-PCBdme als Referenz.

Chromsäureabbau: Die Bilindme aus den 3 Ansätzen wurden mit Chromsäure abgebaut (Pkt. 7.5.2) und die extrahierten Imide im Vergleich mit α^* - und β^* -konfigurierten Sulfonylsuccinimid sowie den aus PCBdme entstehenden Imiden in den Systemen TEC und BDE chromatographiert.

9. Isoelektrische Fokussierung von Gallenfarbstoffen

9.1. Abspaltung der Chromophore

9.1.1. Abspaltung mit Salzsäure

Zur Abspaltung von HCl-PCB vgl. Punkt 7.2.2.2., eingesetzte Menge ca. 300 mg.

Phycoerythrin aus *Porphyridium cruentum* (elektrophoretisch rein¹) (300 mg) wurden mit 10 ml HCl konz 30' inkubiert. Nach Verdünnung mit 30 ml Acetatlösung (200g Natriumacetat/l) zentrifugierte man denaturiertes Protein ab (TZ, 10', 6 000 Upm). Den Überstand schüttelte man mit Chloroform möglichst quantitativ aus und wusch die organische Phase zunächst mit Na-Azetatlösung in kleinen Portionen vorsichtig bis zum Farbumschlag rotviolett nach lachsrosa. Durch Zusatz von weiteren 5 ml Na-Acetat extrahierte man das rote Bilin aus dem Chloroform, anschließend wieder in frisches Chloroform durch Zusatz von wenigen Tropfen HCl. Die Chloroformphase wusch man 3 x mit H₂O dest., 2 x mit H₂O bidest. und engte brachte am Rotationsverdampfer zur Trockene

9.1.2. Abspaltung durch Methanol

Ausgehend von 10 g Algenmaterial (lyophilisierte Porphyridien² bzw. sprühgetrocknete *Spirulina platensis*) wurden die Chromophore durch Kochen in Methanol abgespalten (vgl. Pkt. 6.1.) Nach der Extraktion der Pigmente in Chloroform (vgl. 6.1.) wusch man die organische Phase wie oben und brachte am Rotationsverdampfer zur Trockene.

9.2. Isoelektrische Fokussierung der Gallenfarbstoffe

9.2.1. Technische Daten zur Fokussierung

Bereitung des Gelbettes

Ca. 10 g Sephadex G 100 (Pharmacia) wurden in 100 ml bidest. Wasser mit 2% Servalyt T 3,5 - 10 (Serva) gequollen und im Va-

¹ Für die Überlassung von elektrophoretisch reinem B-PE möchte ich Herrn Dr. H.-P. Köst herzlich danken

² Für die Anzucht der *Porphyridium cruentum* siehe Pkt. 10.

kuum (Wasserstrahlpumpe) entgast. Das in die Gelwanne (Zusatz zum LKB-Multiphor der Fa. LKB) überführte Gel trocknete man bis kurz vor Erreichen des Crackpoints durch vorsichtiges Fönen.

Vorfokussierung

1 h/400 V (Kühlung durch Wasser)

Anolyt: 1 M H_3PO_4 ; Katholyt: 1M NaOH

Fokussierung der Gallenfarbstoffe

Fokussierung der Gallenfarbstoffe

Die Biline wurden in ca. 1 ml Methanol gelöst, mit 2 ml bidest. H_2O versetzt und auf dem Gelbett bei pH ca 7 aufgetragen. Die Fokussierung wurde bei 400 V/30', 600 V/30', 800 V/30' und 1000 V bis zu konstantem Stromfluß durchgeführt.

9.2.2. Analyse der fokussierten Gallenfarbstoffe

Die farbigen Gelzonen wurden herausgekratzt und in Elutions-säulchen überführt. Ampholyt eluierte man mit 5 ml bidest. Wasser und bestimmte den pH-Wert der resultierenden Lösung am pH-Meter. Die Biline wurden mit $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (1:2) quantitativ eluiert. Die Biline wurden in CHCl_3 extrahiert und die organische Phase nach Neutralwaschen mit Wasser mit Stickstoff abgeblasen. Aufnahme der Spektren, Chromatographie mit vorhergehender Veresterung sowie Chromsäureabbau vergleiche die Punkte 6 f.

9.2.3. Titrationsskurven nach Righetti

Die Aufnahme erfolgte gemäß der von LKB gegebenen Vorschrift (Broschüre zum Titrationszusatz des LKB-Multiphors).

Acrylamidgel: PAGE 5% T, 3% C

Trägerampholyt: 2% Servalyt pH 3,5 - 10

Fokussierung in der 1. Dimension: 10 Watt/Gel, 60 °

Elektrophorese in der 2. Dimension: 500 V/10'

Aufgetragen wurde HCl-Bilin aus 30 mg Phycoerythrin bzw. Phycocyanin in 100 ul MeOH/H₂O = 1 : 2.

9.2.4. Spektroskopische Titration

Je 100 ul einer methanolischen Lösung von blauem bzw. rotem, durch Fokussierung gereinigtem Bilin wurden zu 1 ml 0.1 M/l Puffer (siehe unten pipettiert und sofort ein Absorptionsspektrum aufgenommen; anschließend wurde der pH-Wert am pH-Meter nochmals bestimmt. Die Extinktion im Maximum lag bei ca. 0,08 Extinktionseinheiten. Die Werte sind in Tabelle aufgeführt.

Puffer: pH 3: 0,1 M/l Glycin/HCl; pH 4: Na-Citrat/HCl (0,1 M/l)
pH 5 - 8 : Na₂HPO₄/KH₂PO₄ (0,1 M Posphat), pH 9 - 10: Glycin 0,1 M/l/NaOH.

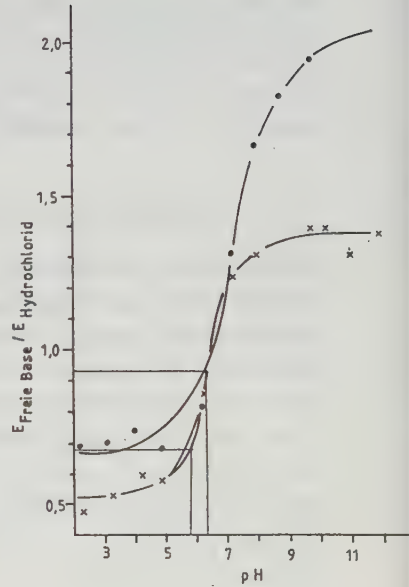
Der Quotient aus der Extinktion $E_{\text{freie Base}}/E_{\text{Hydrochlorid}}$ für eine 1 : 1 Verteilung wurde für das blaue Bilin zu 0,68 für das rote Bilin zu 0,93 nach folgender Gleichung berechnet:

$$\frac{E_{\text{Freie Base}}}{E_{\text{Hydrochlorid}}} =$$

$$E_{\text{Freie Base der Freien Base}} + E_{\text{Freie Base d. Hydrochlorids}}$$

$$E_{\text{Hydrochlorid d. Freien Base}} + E_{\text{Hydrochlorid d. Hydrochlorids}}$$

pH	E _{515 nm}	E _{555 nm}	E _{515 nm} /E _{555 nm}	"Rotes Bilin"
2,07	11,7	16,8	0,70	
2,98	20,6	29,7	0,70	
3,98	23,9	32,5	0,74	
4,82	20,5	30,0	0,68	
6,11	14,3	17,4	0,82	
7,11	11,4	8,6	1,33	
7,95	10,3	6,2	1,66	
8,71	14,0	7,7	1,82	
9,59	14,0	7,2	1,94	
pH	E _{590 nm}	E _{665 nm}	E _{590 nm} /E _{665 nm}	"Blaues Bilin"
2,17	6,80	14,2	0,48	
3,15	6,6	13,5	0,60	
4,80	6,2	13,0	0,48	
6,11	6,0	7,0	0,85	
7,50	5,0	3,9	1,28	
7,86	5,1	3,9	1,31	
9,61	5,2	7,6	1,39	
10,11	8,3	6,0	1,38	
10,90	5,2	4,0	1,30	
11,70	4,8	3,5	1,37	



Spektrophotometrische Titration des durch Isoelektrische Fokussierung gewonnen "Roten Bilins" (oben) und des "Blaues Bilins" (unten). pH-Werte wurden nach Zugabe des Bilins gemessen; Extinktionen sind in cm Peakhöhe zur Basis (Wendepunkte der Absorptionskurve angegeben).

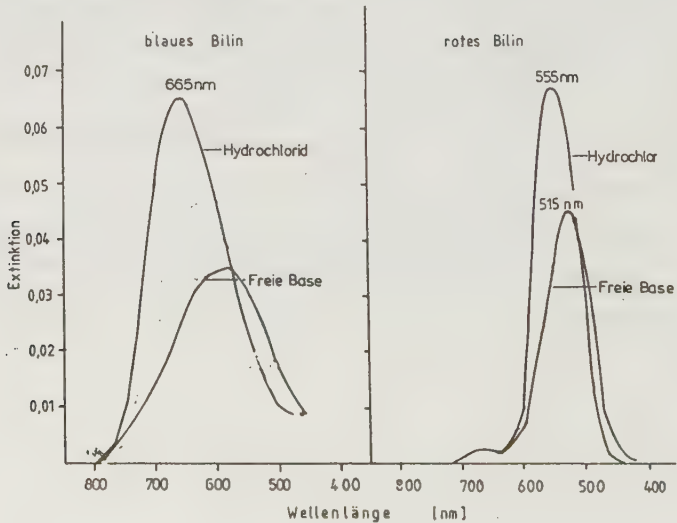


Abb. 56:

Absorptionsspektren des blauen Bilins (IEP 4.15) und des roten Bilins (IEP 4.30) in wässrigem Puffer; pH 9 Freie Base; Puffer pH 3 Hydrochlorid. Der pKa beträgt 5,8 für das Bilin (IEP 4,15) und 6.4 für das rote Bilin (IEP 4,30)

10. Untersuchungen zur Haptenwirkung von kurzkettigen Bili-peptiden am Beispiel von Phycoerythrin-Peptiden
- 10.1. Immunisierung der Kaninchen mit gekoppelten Phycoerythrin-peptiden
- 10.1.1. Präparation der Phycoerythrinpeptide

Die Isolierung von Phycoerythrin erfolgte nach E. Köst-Reyes, 1978, aus Porphyridium cruentum (Anzucht der Algen nach E. Köst-Reyes, 1978 in Medium I, vgl. 6.1., unter Schütteln) durch fraktionierte Ammoniumsulfatfällung bei 25% und 40% Sättigung in 0.1 M Tris/HCl-Buffer, pH 7,6.

Der Abbau des Phycoerythrins mit Pepsin erfolgte nach H.-P. Köst, 1974, bei einem pH von 1.8 (ungepuffert dest. H₂O/HCl) mit 10fa-chem Enzymüberschuß (g PE/10 g Pepsin).

Die Extraktion der Phycoerythrin-Chromopeptide erfolgte mit Butanol: jeweils 20 ml Proteolysegemisch wurden mit 1 ml HCl konz. versetzt und die Chromopeptide mit Butanol quantitativ extrahiert.¹ Die Butanolphase wurde solange mit Eiswasser gewaschen, bis das Waschwasser einen pH von 4-5 aufwies. Die dabei in das Wasser extrahierten Chromopeptide wurden erneut mit Butanol extrahiert. Durch Zusatz des 3fachen Volumens Petrolether (K.p. 40-60° C) zum Butanol extrahierte man die PE-Peptide erneut in Wasser und reinigte durch Absorptionschromatographie weiter auf.

Die Absorptionschromatographie erfolgte nach H.-P. Köst, 1974: Die an Kieselgel G 60 bei einem pH von 4 (Pyridin) adsorbierten Chromopeptide wurden mit dest. H₂O solange gewaschen, bis die Leitfähigkeit des Eluats dem von dest. H₂O entsprach; die Elution der PE-Chromopeptide erfolgte mit 2% wässrigem Pyridin. Der pH des Eluats wurde mit Eisessig auf 4,5 eingestellt (Pyridin/Eisessig) und die Chromopeptide gefriergetrocknet.

10.1.2. Kopplung der PE-Peptide an einen Träger

10.1.2.1. Kopplung an Haemocyanin

Zu 10 ml PE-Peptid (E_{555 nm} = 0.5 ml) in dest. Wasser gab man 100 ul Glutardialdehyd (GA) sowie 100 ul Haemocyanin (HC) (1,5 mg/ml²)

¹ Auftretende Emulsionen wurden durch Zentrifugation in der TZ (8 000 Upm, 5') gebrochen.

² Proteinbestimmung erfolgte nach Biorad, 19 ; für die Eichkurven möchte ich Herrn G. Henkelmann herzlich danken.

gegeben. Nach 1 h-Inkubation bei 4° C wurden weitere 10 ml PE-Peptidlösung (s.o.) zugegeben, 1 h inkubiert und zur Entfernung überschüssigen GA gefriergetrocknet. Die Gefrier Trocknung wurde wiederholt, wenn der Rückstand noch stark nach GA roch. Anschließend nahm man den Rückstand in PBS-Puffer (5 ml, pH 6.8) auf und das HC-PE-Peptidkonjugat durch schnelle (!) Zugabe von 40% Ammoniumsulfat im Eis ausgefällt sowie abzentrifugiert (TZ, 10 000 Upm, 15'). Der Niederschlag wurde in PBS-Puffer (4 ml, pH 6.8) aufgenommen. Die PE-HC-Konjugate wiesen eine $E_{555 \text{ nm}}$ von ca. 3.7/ml auf; der Gehalt an Haemocyanin betrug 9,5 mg/ml.

10.1.2.2. Kopplung an CNBr-aktivierte Sepharose

1 mg PE-Peptid wurde an 1 g CNBr-aktivierte Sepharose nach den Bedingungen des Herstellers (Pharmacia, Schweden) fixiert. Verbliebene reaktive Gruppen der Sepharose 4B wurden mit 1M Glycinslösung in Kupplungspuffer abgesättigt (Kupplungspuffer: 0,1 M NaHCO_3 , 1 M NaCl). Das Konjugat wurde mit Kupplungspuffer gewaschen, die anderen Waschzyklen unterblieben. Das in PBS-Puffer aufgenommene Konjugat wies eine Absorption von 10.24/1g Naßgewicht¹ und ml auf. (PE-S)

10.1.2. Immunisierung der Kaninchen mit dem PE-Konjugat

4 ml PE-HC bzw. Sepharose-PE-Peptid (PE-S) wurden mit 6 ml komplettem Freund'schen Adjuvans (CFA) versetzt und kräftig emulgiert. Je 2 ml wurden insgesamt 10 Kaninchen (je 5 für die Immunisierung mit PE-S bzw. PE-HC) an multiplen Stellen interdermal injiziert. Nach 14, 35 und 75 Tagen (PE-S) bzw. 9, 46 und 53 Tagen (PE-HC) erfolgten Booster-Injektionen nach demselben Schema. Die pro Kaninchen injizierte Menge an PE-Konjugat ist Tab. 7 zu entnehmen:

Tab. 7

Pro Kaninchen injizierte Menge an PE-Konjugat:

PE-HC:	$E_{555 \text{ nm}}$	0,75/2,4 mg HC
PE-S:	$E_{555 \text{ nm}}$	0,77/0,075 g abgetropftes Gel ¹

¹ Zur Gewichtsbestimmung wurde das PE-S in Elutionsröhrchen (Fa. LKB) überführt und 1/2 h abgetropft. Die Wägung erfolgte an einer Mikrowaage.

8, 16 und 35 Tage nach der letzten Injektion wurden die Kaninchen geblutet und das vom Blutkuchen abzentrifugierte Serum (= primärer Antikörper) bei -19°C gelagert.

10.2. Ausschluß von PE-Peptid-spezifischen Antikörpern

10.2.1. Immunologische Versuche mit ^{12}C -PE-Peptiden

10.2.1.1. Nachweis HC-spezifischer Antikörper im Ouchterlony-Doppeldiffusionstest

Herstellung der Agarose-Diffusionsplatten (5 ml/Platte $\varnothing$ 5 cm) erfolgte nach BEHRING, 1971 (1g Agarose in 100 ml PBS-Puffer, pH 7; 8,4 g NaCl/l, 0,2 M Phosphat). Mittels einer an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossene Stanze wurden 6 auf einem Kreis liegende Vertiefungen ($\varnothing$ 2 mm, Inhalt min. 5 μl) und ein Zentralzylinder gestanzt (Durchmesser des Kreises 2 cm; vor dem Stanzen ist eine 1 tägige Lagerung der Platten in einer feuchten Kammer empfehlenswert).

Durchführung des einfachen Ouchterlony-Diffusionstest: 5 μl , 4 μl , 3 μl , 2 μl , 1 μl Haemocyanin (= Antigen; OD 0,1/ml bei 660 nm) bzw. 5 μl PBS-Puffer (s.o.) wurden in die äußeren Vertiefungen pipettiert, in die mittlere Vertiefung wurden jeweils 5 μl Antiserum (HC 1 HC 5) aus jeweils 3 Blutungen eingebracht. Nach 1 d Inkubation bei 22°C in einer feuchten Kammer wurden weiße Präzipitationslinien bei allen Verdünnungen sichtbar.

10.2.1.1. Versuchter Nachweis von PE-Peptidspezifischen Antikörpern (Elektronenoptisch, durch Postpräzipitation sowie modifizierten Ouchterlony-Test)

Elektronenoptisch

Lyophilisiertes PE-Peptid in PBS-Puffer (s.o.; $E_{555\text{ nm}}$ ca. 5/ml, je 0,1 ml) wurden mit 0,2 ml des jeweiligen Serums (PE-S 1-5, PE-HC 1-5, alle Blutungen) versetzt. Als Nullproben dienten 0,1 ml PE-Peptid-Lösung (s. o.) in 0,2 ml unspezifischen Serum (Anti-Phycobilisomenserum, Herstellung vgl. Sepp, E. et al. 1982). Quantitative oder qualitative Änderungen im Absorptionsspektrum der Immunansätze verglichen mit den Nullproben traten nicht auf.

Durch Postpräzipitation

Je 0,1 ml PE-Peptid ($E_{555 \text{ nm}}$ ca. 2/ml PBS-Puffer) in PBS-Puffer wurden mit 100 μ l, 50 μ l und 20 μ l HC-3 Serum versetzt und mit PBS-Puffer (s.o.) auf 0,8 ml aufgefüllt. Nach 1 h Inkubation bei 37° C unter Lichtschutz wurden die Immunansätze geteilt: Zu je 400 μ l des Immunansatzes gab man entweder 400 μ l Ammoniumsulfat (4 M in H₂O dest., pH 7,5) oder 100 μ l Anti-Kaninchen-IgG-Serum (v.d. Ziege, unverdünnt¹). Nach 0,5 h Inkubation bei RT (Ammoniumsulfatfällung) bzw. 1 h Inkubation bei 37° C (Immunpräzipitation) wurde abzentrifugiert. (MZ, 10 000 g, 10'). Als Nullproben diente PE-Peptid (s.o.) bzw. unverdünntes HC 3 Serum in Puffer (PBS s.o.) sowie PE-Peptid in unspezifischen Serum (Anti-PC¹-Serum). Die Immunpräzipitate waren ungefärbt, d.h. Hapten-Antikörperkomplexe fehlten.

Modifizierter Ouchterlony-Test

Für die Herstellung der Platten vgl. 10.2.1.1.:

In den Zentralzylinder pipettierte man 5 μ l Antiserum (entweder HC 3, C 4, S1, S 2) und nach dem Einziehen der Probe 10 μ l PE-Peptid in PBS-Puffer ($E_{555 \text{ nm}}$ 2/ml). In die äußeren Löcher wurden 5 μ l PBS-Puffer (s.o.) bzw. 2 μ l, 4 μ l, 8 μ l, 10 μ l und 12 μ l Anti-Kaninchen-IgG-Serum (unverdünnt, Ziege¹) pipettiert. Da das Volumen der Lösungen den Rauminhalt der Vertiefungen übersteigt, wurden die Proben in kleineren Portionen zupipettiert, wobei die Lösung in spätestens 5' vollständig in das Gel eingezogen ist. Nach drei Tagen waren weiße Präzipitationslinien (Kaninchen-IgG/Antikaninchen-IgG) sichtbar, während das rote PECP über das ganze Gel verschmiert war; d.h. präzipitierbare Hapten-Antikörperkomplexe fehlten auch hier.

¹ Für die Überlassung der Seren möchte ich Herrn Dr. J. Eder, MPI Martinsried, herzlich danken.

10.2.2. Immunologische Versuche mit ^{14}C -PE-Peptiden

10.2.2.1. Technische Daten zur Bestimmung der ^{14}C -Aktivität in dpm

Bestimmung der ^{14}C -Aktivität

Die Proben wurden mit 10 ml Szintillationscocktail (Rotiszint 22) versetzt und 5' in einem Szintillationszähler der Fa. Kontron gezählt. Von den im Fenster A und Fenster B (fixed window, ^{14}C) bestimmten cpm wurde automatisch ein vorher mit dest. H_2O in Szintcocktail (s.o.) bestimmtes Null-Rauschen (Fenster A 11 cpm, Fenster B 15 dpm) abgezogen. Anhand einer vorher eingespeicherten Quenchkurve wurden die cpm-Werte nach der SCR-Methode (Second Channel Ratio) in dpm umgerechnet.

Aufnahme der Quenchkurve

Die Aufnahme der Quenchkurve für das SCR-Verfahren¹ erfolgte lt. dem Handbuch der Fa. Kontron:

Zu 1 Probe mit 110 000 dpm wurden sukzessiv steigende Volumina an Aceton als Quencher zupipettiert. Die Probe wurde jeweils nach Zusatz von Aceton gemessen und dadurch über ein geräteinternes Programm eine Quenchkurve eingespeichert. Die Quenchkurve wurde anhand eines ^{14}C -Standarts der Fa. Beckmann mit 27 000 dpm getestet: die in Fenster A = 2082 cpm und Fenster B = 15 163 cpm gemessene Aktivität wurde zu 29040 berechnet. Das bedeutet eine Abweichung von + 7,5 %.

10.2.2.2. Darstellung von ^{14}C -PE-Peptid

10.2.2.2.1. Anzucht von *Porphyridium cruentum* in ^{14}C -Medium

100 ml Medium II in 300 ml Enghalserlenmeyer-Kolben wurden mit 5 ml einer dicht angewachsenen Stammkultur (vgl. 10.1.1., Medium I) angeimpft (Tag 0). Zugabe und Aktivität der $\text{Na}_2^{14}\text{CO}_3$ -Lö-

¹ Bei der SCR-Methode wird das Verhältnis der in Fenster A und B gemessenen cpm bestimmt und daraus anhand eines gespeicherten, ungequentschten Emissionsspektrums der Quenchgrad bestimmt und auf die tatsächlichen Zerfälle (dpm) rückgerechnet. (vgl. Kontron-Handbuch)

² Die Probe wurde durch Verdünnen einer $^{14}\text{CO}_3$ -Lösung (Amersham) hergestellt.

sung (Amersham; verdünnt in dest. Wasser) sind der Tabelle 8 zu entnehmen. Die Algen zog man unter Schütteln bei 387 LUX und $20^{\circ} - 24^{\circ} \text{ C}^3$. Nach der letzten Zugabe von $\text{Na}_2^{14}\text{CO}_3$ -Lösung zog man die Algen bei Grünlicht (Absorptionsmaxima der verwendeten Grünfolie 580 nm und 520 nm; $580 \text{ m}/520 \text{ nm} = 1,2$).

Tabelle 8

Tag der Zugabe sowie Aktivität (aus der Verdünnung berechnet) der $\text{Na}_2^{14}\text{CO}_3$ -Lösung; Die Pfeile geben den Beginn des Wachstums im Grünlicht an.

Versuchs-Tag reihe	^{14}C -Aktivität (dpm) Gesamtansatz)	$\emptyset$ ^{14}C -Aktivität/Kolben (dpm)	dpm/ml
0	$1,76 \times 10^8$	$4,40 \times 10^7$	$4,19 \times 10^5$
I 9	$1,76 \times 10^8$	$4,40 \times 10^7$	$4,19 \times 10^5$
17	$\rightarrow 3,52 \times 10^8$	$8,80 \times 10^7$	$8,38 \times 10^5$
Σ	$7,04 \times 10^8$	$1,76 \times 10^8$	$1,68 \times 10^6$

10.2.2.2.1. Bestimmung der ^{14}C -Aufnahme durch die Algen und Zellzahlbestimmung

Ab d = 1 entnahm man jeden zweiten Tag aus einem bestimmten Erlenmeyerkolben (=Zählprobe) 3 mal je 100 ul Lösung¹. Aus einem Aliquot wurde die Zellzahl in einer Erythrozytehnzählkammer bestimmt. Ein Aliquot zählte man im Szintillationszähler (Gesamtradioaktivität in Algen und Medium); das andere Aliquot versetzte man mit 2 ml H_2O dest., zentrifugierte (8 000 Upm, 5', TZ). Der Überstand

³ Die Messung der Umgebungstemperatur erfolgte mittels eines Minimum-Maximum-Thermometers.

¹ Da sich die Porphyridien nach stärkerem Anwachsen ringförmig an der Glaswand absetzen und in größeren "Kolonien" zusammenlagern, wurde der Kolben kräftig aufgewirbelt und die Proben an einer Stelle entnommen, die dem halben Radius des Kolbens entsprach. Parallellproben mit 3 x 100 ul-Aliquoten bewiesen die Reproduzierbarkeit der Entnahme an einem Tag. Schwankungen sind jedoch bei Entnahmen an verschiedenen Tagen zu erwarten.

wurde abdekantiert, das Algenpellet in 2 ml H₂O dest. aufgenommen und wie oben zentrifugiert. Den Waschwasserüberstand vereinigte man mit dem ersten Überstand und bestimmte im Szintillationszähler die dpm (= Radioaktivität des Mediums). Aus der Differenz "Gesamtradioaktivität - Aktivität des Mediums" errechnet sich die Radioaktivität der Algen, aus dem Quotienten Radioaktivität der Algen : Zellzahl/ml die Radioaktivität pro Algenzelle. (vgl. Tabelle 9). Am Ende der Versuchsreihe 17 d + 6 h Wachstum wurden die oben genannten Parameter für alle 4 Kolben sowie für die vereinigten Algensuspensionen bestimmt. Zusätzlich bestimmte man das Volumen der einzelnen Erlenmeyerkolben (vgl. Tab. 9)

Tag	Suspension dpm/ml	Medium dpm/ml	Algen dpm/ml	Zellzahl /mlx10 ⁵	Zelle dpm
0	601940	-	-	-	-
1	446980	104370	342610	2,2	1,22
3	203410	86770	116640	3,5	0,33
5	204230	72170	132060	4,3	0,28
7	201740	91650	110090	13,2	0,08
9	242630	90670	151710	23,8	0,05
11	696820	210370	486450	42,8	0,11
13	676610	177080	499530	38,0	0,13
15	819290	212810	606430	73,1	0,08
17	836720	212230	624490	64,0	0,09
17 + 6h	1552460	510350	1042110	61,8	0,17

Kolben Nr.	Volumen ml	Suspension dpm/mlx10 ³	Medium dpm/mlx10 ³	Algen dpm/mlx10 ³	Zellzahl /mlx10 ⁵	dpm/Zelle x10 ⁻²	dpm/Biomasse + Kolben x10 ³
Zählprobe	90	1552	510	1042	62	17	93790
2	120	1130	344	786	34	23	94319
3	100	1348	409	939	50	19	93902
4	100	1378	503	875	46	19	87475
Vereinigte Suspensionen							
(bestimmt)	410	1193	309	883	43	21	362227
(berechnet)	-	1352	442	910	48	20	-

Tabelle 9

Die dpm/ml der Suspension bzw. des Mediums, sowie die Zellzahl pro Milliliter wurden direkt bestimmt; die dpm der Algenmasse (suspendiert in 1 ml Medium) bzw. der einzelnen Zelle errechnet sich aus den drei bestimmten Größen. Die Pfeile markieren die Zugabe von ¹⁴CO₃-Lösung.

10.2.2.2.3. Darstellung von ^{14}C -Phycoerythrinpeptiden¹

Bei jedem Arbeitsschritt wurde das Volumen der Lösung bestimmt und 3 unabhängig voneinander entnommene Aliquote (100 μl bei der Darstellung von ^{14}C -Phycoerythrin; 10 μl bei der Aufreinigung der Chromopeptide soweit nicht anders vermerkt.) Die Werte finden sich in der Tabelle , A und B; die Gesamt dpm errechnen sich aus den dpm/Probe x dem Gesamtvolumen, die prozentuale Ausbeute an wiedergefundener Radioaktivität ist bezogen auf die eingesetzte Menge ($7,04 \times 10^8$ /Versuchsreihe 1) bzw. auf die Gesamtradioaktivität des Abbaugemisches.

Am 17. Wachstumstag (+ 6 h) wurden die vereinigten Algensuspensionen abzentrifugiert (20', 36 000 g): Der Überstand wurde abdekantiert, das Algenpellet in kaltem carbonatfreiem Medium II aufgenommen, 10' mit einem Glasstab gerührt und wie oben zentrifugiert. Die geernteten Algen (Naßgewicht 3,58 g) wurden in dest. Wasser aufgenommen und eingefroren (- 19° C). Die aufgetauten Algen wurden mit 0,1 M Tris/HCl-Puffer, pH 7,6 auf 31 ml aufgefüllt und durch 2maliges Passieren einer French-Press-Zelle bei einem Druck von 15 000 PSI weiter aufgeschlossen. Man verdünnte mit Tris (pH 7,6, 1 M Tris/HCl) auf 90 ml und zentrifugierte (36 000 g, 20'). Das Pellet wurde nochmals durch 10-minütiges Rühren in Tris-Puffer (s.o.) extrahiert, zentrifugiert (s.o.) und der Überstand mit dem ersten vereinigt. Das Pellet wog 1,02 g; 0,012 g wurden direkt im Szintillationszähler gezählt. Die Überstände wurden bei 25% bzw. 40% Sättigung an Ammoniumsulfat fraktioniert gefällt und das Pellet der 40%-Fällung gegen dest. H_2O dialysiert sowie gefriergetrocknet. Es ergibt sich in dest. H_2O eine $E_{555 \text{ nm}}$ von 1 bei 262 028 dpm/ml.

^{14}C -Phycoerythrin wurde in 5% Ameisensäure (pH 1,7) aufgenommen, mit 0,02 mg Pepsin versetzt und die Lösung mit N_2 gespült. Nach 6 h bzw. 12 h Reaktionsdauer setzte man nochmals 0,02 mg Pepsin zu. Nach insgesamt 24 h Inkubation bei 37° unter Rühren wurden die Chromopeptide analog Punkt 10.1.1. in Butanol extrahiert und

¹ Vgl. dazu Punkt 10.1.1. sowie E.Köst-Reyes, 1978 und H.-P. Köst, 1974

Aufarbeitungsschritt	Volumen ml	dpm/Probe (100 µl)	dpm Gesamt $\times 10^6$	% eingesetz- te Menge
Algensuspension	420	13777	579	82,2
Überstand	420	2038	86	12,2
Waschwasser	276	117	3	0,5
Medium (ber.)			89	12,6
Pellet (ber.)			450	70,0
Extrakt n. Aufschluß	90	42975	387	55,0
Überstand, 1. Zentrifugation	90	24770	223	31,7
Überstand, 2. Zentrifugation	51	1303	7	1,0
Gesamtüberstände	141	16326	230	32,7
Pellet 1,02 g		1321195 ²	112	16,0
Pellet (ber.)			157	22,2
Ammoniumsulfatfäll- lung: 25 %:				
Überstand	164	77966	131	18,5
Pellet	28	5432	15	2,3
40 %:				
Überstand	214	2147	46	6,5
Pellet	57	14507	83	11,8
Nach Dialyse	155	4821	75	10,6
¹ Für die Szintillationsmessung wurden 100 µl eingesetzt ² Das Gewicht des gemessenen Aliquots betrug 12 mg.				

Arbeitsschritt	Volumen ml	dpm/Probe (10 µl)	dpm Gesamt $\times 10^5$	% dpm Abbaugemisch
Abbaugemisch	67	5260	352	= 100
Butanolphase	178 m	592	105	29,9
Restwasser	34	5141	175	49,6
Waschwasser	57	1377	65	18,4
Petrolether	700	16 ¹	12	3,3
Wasser	102	843	86	24,4
Elutionspuffer mit Chromopeptiden	448	33 ²	15	4,2
Waschwasser (vgl. Tab. Elutionsprofil)			45	12,8
¹ Für die Szintillationsmessung wurde 1 ml eingesetzt ² Für die Szintillationsmessung wurde 0,1 ml eingesetzt.				

Tabelle 10

- A: Bei der Darstellung von ^{14}C -Phytoerythrin bestimmte man bei jedem Arbeitsschritt Volumen und dpm der jeweiligen Lösung. Aus dem Volumen $\times$ den dpm/Probe errechnet sich die Gesamtradioaktivität, daraus bezogen auf die eingesetzte Menge an Radioaktivität = $7,04 \times 10^8$ dpm/Versuchsreihe die prozentuale wiedergefundene Radioaktivität. Probe = 100 µl
- B: Wie oben wurden Volumen und dpm der Lösung auch bei der Reinigung der Chromopeptide bestimmt und aus den Werten die Gesamtradioaktivität und die % Radioaktivität berechnet. Bezugspunkt ist hier die Radioaktivität des Proteolysegemisches, die gleich 100 % gesetzt wird. Probe = 10 µl.

µl Elutions- Wasser (additiv)	dpm/500 µl	Gesamt-dpm
100	27	5400
200	15692	3138400
300	4740	948000
400	1575	315000
500	859	171800
600	451	90200
700	343	68600
800	245	49000
900	676	135200
1000	344	68800
1300	499	299400
1600	349	209400
1700	385	38500
1800	338	67600
1900	208	41600
Gesamt-radioaktivität im Eluat		4510200

Tabelle 11

Elutionsprofil der chrophorfreien Peptide von Kieselgel: die dpm in 500 µl der jeweiligen Fraktionen wurde im Szintillationszähler bestimmt und auf die Gesamt-radioaktivität/Fraktion umgerechnet.

durch Adsorptionschromatographie an Kieselgel aufgereinigt. Das Elutionsprofil farbloser Peptide verfolgte man anhand der Radioaktivität des Eluates (vgl. Tabelle ..). Für die eluierten Peptide ergab sich eine $E_{555 \text{ nm}}$ von 0,062 bei 3346 dpm, was einer Aktivität von 53968 dpm/ml bei einer $E_{555 \text{ nm}} = 1$ entspricht.

10.2.3. Test der Antiseren mit ^{14}C -PE-Peptid durch Radioaktivitätsmessung des Überstandes nach Postpräzipitation mit Anti-Kaninchen-IgG

10.2.3.1. Bestimmung der optimalen Anti-IgG-Menge für die Postpräzipitation

1 mg Anti-Kaninchen-IgG (v.d. Ziege, Sigma, Titer 1 : 16) wurden in 2.0 ml 0.85% NaCl-Lösung verdünnt. 20 µl wurden mit 20 µl einer Verdünnungsreihe (1 : 4, 1 : 8 ... 1 : 64) verschiedener Antiseren (PE-S 1, 3 und 4 bzw. PE-HC 1 und 3) gemischt. Nach 1 h Inkubation bei 37° C wurde 16 h bei 4° C inkubiert und danach

Tabelle: 12

Zur Bestimmung der optimalen Anti-IgG-Menge für die Postpräzipitation wurde die Menge an Anti-Kaninchen-IgG konstant gehalten und die Menge des primären Antikörpers (Antiseren gegen PE-Peptid?) variiert. Maximale Extinktion bei 578 nm bedeutet gleichzeitig maximale Fällung.

Serum	Blutung	Verdünnung	E _{578 nm} des Immunpräzipitates
HC 1	26.6.	1 : 4	0,93
		1 : 8	1,44
		1 : 16	1,53
		1 : 32	1,44
		1 : 64	1,23
HC 3	26.6	1 : 4	1,11
		1 : 8	1,40
		1 : 16	1,35
		1 : 32	1,20
		1 : 64	0,90
S 1	26.6.	1 : 4	0,84
		1 : 8	1,35
		1 : 16	1,46
		1 : 32	1,46
		1 : 64	0,90
S 3	7.6.	1 : 4	1,30
		1 : 8	1,38
		1 : 16	1,44
		1 : 32	1,28
		1 : 64	1,18
S 4	7.6	1 : 4	1,36
		1 : 8	1,54
		1 : 16	1,50
		1 : 32	1,30
		1 : 64	0,84

abzentrifugiert (MZ, 10', 10 000 Upm). Die Präzipitate wurden 2 mal mit PBS-Puffer gewaschen und dabei wie oben zentrifugiert. Die Pellets versetzte man mit 200 µl Biorad-Proteinbestimmungsreagenz und verdünnte nach der vollständigen (!) Lösung mit 800 µl H₂O dest. Die Extinktion der Lösung bei 578 nm wurde im Spektrophotometer bei 578 nm bestimmt (Tabelle 12)

Serum	Blutung	radioaktive Zerfälle pro Minute (dpm) in				
		50 µl Überstand +++	Gesamtüberstand	Gesamt pellet +++	Pellet + Überstand	Pellet/ Pellet +Überstand
S-1	30.5	1263	3536	75	3611	2,1
S-2		1283	3592	104	3696	2,8
S-3		1305	3654	77	3731	2,1
S-4		1285	3598	56	3654	1,5
S-5		1291	3615	60	3675	1,6
S-1	7.6	1280	3584	84	3668	2,3
S-2		1225	3430	74	3504	2,1
S-3		1135	3178	53	3231	1,6
S-4		1315	3683	61	3743	1,6
S-5		1294	3623	73	3696	2,0
S-1	26.6	1250	3500	79	3579	2,2
S-2		1102	3086	75	3161	2,5
S-3		1275	3570	83	3653	2,3
S-4		1194	3343	63	3406	1,8
S-5		1185	3318	66	3384	2,0
PC 3		1270	3556	62	3618	1,7
PC 2		1227	3436	69	3505	2,0
PBC 5		1280	3584	76	3660	2,1
HC-1	30.5	1242	3478	70	3548	2,0
HC-2		1203	3368	70	3438	2,0
HC-3		1214	3399	66	3465	1,9
HC-4		1241	3475	69	3544	1,9
HC-5		1076	3013	76	3091	2,5
HC-1	7.6	1252	3506	74	3580	2,1
HC-2		1301	3645	60	3947	2,0
HC-3		1302	3646	73	3719	2,0
HC-4		1242	3478	98	3576	2,7
HC-5		1272	3562	68	3630	1,9
HC-1	26.6	1262	3534	73	3607	2,0
HC-2		1276	3573	76	3649	2,1
HC-3		1236	3461	62	3523	1,8
HC-4		1215	3402	92	3492	2,6
HC-5		1262	3534	52	3586	1,5

Tab.: 13

Radioaktivitätsverteilung nach der Postpräzipitation in Überstand und Präzipitat des Immunansatzes

+++ = gemessene Werte, die anderen Werte wurden berechnet.

10.2.3.2. Test der Antiseren mit ^{14}C -PE-Peptid

Je 3 x 100 μl ^{14}C -PE-Peptid ($E_{555\text{ nm}} = 0,29/\text{ml}$ bzw. 35200 dpm/ml)¹ wurden mit jeweils 20 μl 1 : 10 verdünntes Antiserum versetzt. Als Nullproben wurden je 100 μl ^{14}C -PE-Peptid mit unspezifischen Serum (Anti-PC-Serum 2 und 3, Anti-Phycobilisomenserum) in gleicher Verdünnung gemischt. Nach 1 h Inkubation bei 37° C und 16 h Inkubation bei 4° C wurden die Immunansätze mit 20 μl Anti-IgG-Serum (1 mg/ml, Titer 1 : 16, Sigma) versetzt und erneut inkubiert (3 h bei 37° C und 5 h bei 4° C. Nach der Zentrifugation (MZ, 10', 10 000 Upm) wurden 50 μl der jeweiligen Überstände in je 10 ml Rotiszintcocktail gezählt. Die restlichen Überstände pipettierte man ab, wusch die Immunpräzipitate 2 x mit PBS-Puff- und löste sie in 100 μl Ameisensäure auf. Nach Zusatz von Rotiszintcocktail wurden die Proben im Szintillationszähler gemessen. Die Mittelwerte der Zerfälle (dpm) im Überstand sowie im Pellet sind in Tabelle aufgeführt, zusätzlich die berechneten Werte dpm im Gesamtüberstand, dpm/Überstand + Pellet sowie die präzipitierte Radioaktivität relativ zur wiedergefundenen Radioaktivität, Tabelle 13. Wie aus der Tabelle ersichtlich, schwankt die in 50 μl Überstand gefundene Aktivität um 1245 dpm (= 3486 dpm/Gesamtüberstand) bei den getesteten Seren bzw. 1262 dpm/50 μl Überstand (= 3534 dpm/Gesamtüberstand) bei den Nullproben. (vgl. dazu Abb. 53). Im Gesamtpellet (primärer + sekundärer Antikörper) wurden Werte von 69 dpm/Probe bei den Nullproben bzw. 73 dpm/Probe bei den getesteten Seren gefunden (Einzelwerte siehe Tabelle 13 und Abb. 53. Die prozentual präzipitierte Radioaktivität schwankt damit um 1,9% bei den Nullproben bzw. 2,1 % bei den getesteten Seren, bezogen auf die in Pellet und Überstand gefundene Radioaktivität.

¹ Bei einem Gesamtvolumen des Immunansatzes von 140 μl ergibt das eine Aktivität von 2514.3/100 μl bzw. 1257.2 dpm/50 μl (Probe).

11.1. Nachweis von pyrrolischen Substanzen im Medium von
Synechococcus 6301

11.1. Anzucht der Algen

Die Anzucht der Algen erfolgte in "Schwefelmangelmedium" (6.1.) bei 35° C, Spülen mit Luft bei 30 000 Lux (vgl. auch Wanner et. al. 1986). Die Ernte erfolgt nach 70 h durch Zentrifugation bei 14 000 g). Wanner et. al. 1986)

11.2. Gewinnung des Extraktes

Algenfreies Medium wurde quantitativ mit Butanol extrahiert, nachdem man die Algen durch Zentrifugation (s.o.) möglichst vollständig entfernt hatte. Die Chromatographie der Pigmente erfolgte in Fließmittel A im Vergleich mit einem Chloroform/Methanol-Extrakt der Algen auf HPTLC-Platten. Extra- und intrazelluläre Farbstoffe waren dabei nicht identisch. Die Veresterung der mit Butanol extrahierten Pigmente erfolgte analog Seite 116.

Die Extraktion mit gleichzeitiger Veresterung aus lyophilisiertem, von den Algen abzentrifugiertem Medium erfolgte durch 1/2 h Rühren bei RT und 12-16 h Inkubation bei -19° C. Die Extraktion der Pigmente aus dem Veresterungsgemisch erfolgte wie oben mit CHCl_3 .

11.3. 2-dimensionale DC: Chromatographie der Pigmente und der Chrmsäure-Abbauprodukte

Die in Aceton gelösten Pigmente wurden punktförmig auf TLC-Platten (mit Fluoreszenz-Indikator) aufgetragen und im System A entwickelt (Seite 110). Nach der Überprüfung unter der UV-Lampe wurden die Pigmente auf der Platte mit Chrmsäure abgebaut (Seite 119) und die Platte im System CEC (Seite 111) senkrecht zur 1. Dimension entwickelt. Die Visualisierung der Bruchstücke erfolgte mit TMB (Seite 121).

11.4. Vergleich von verestertem und unverestertem Extrakt und Nullproben

Butanolische Mediumextrakte wurden unverestert und verestert mit Hilfe der 2-dimensionalen DC analysiert. Als Nullproben wurde ungebrauchtes verestertes "Schwefelmangelmedium" bzw. mit 6% H_2SO_4 /Methanol verestertes Edta (Veresterung vgl. S. 116)

in gleicher Weise analysiert. Nur im veresterten Extrakt des Mediums von Schwefelmangelalgen ließ sich das typische Imidmuster nachweisen.

Inkubation von Methylphaeophorbid und PCBdme

11.4. Inkubation von Methylphaeophorbid und PCBdme

Methylphaeophorbid (hRF in A = 75) fällt in größeren Mengen bei der methanolytischen Gewinnung von PCB aus Spirulina platensis (vgl. 7.1.) an; es wurde wie PCBdme (7.1.) auf HPTLC-Platten gereinigt (als dme). Beide Substanzen wurden jeweils in Methanol gelöst und 7 Tage bei 35° C, 30 000 Lux und ständigem Spülen mit Luft in sterilen Waschflaschen (Wattefilter für An- und Abluft) inkubiert. Jeweils die andere Hälfte der methanolischen Lösungen von Methylphaeophorbid und PCBdme wurde abgeblasen und bei -19° C gelagert. Referenzen und Inkubationsmischungen wurden mit H₂SO₄/Methanol wie ein Mediumextrakt verestert. Die Analyse erfolgte mit Hilfe der 2-dimensionalen DC: man trug jeweils Referenz und Inkubationsmisch punktförmig an jeweils einem Ende einer TLC-Platte (mit Fluoreszenzindikator) auf und entwickelte in System A; dieses Verfahren garantiert gleiche Verhältnisse bei der DC der Pigmente in der 1. Dimension. Nach dem Chromsäureabbau der chromatographierten Substanzen (vgl. S. 119) entwickelte man senkrecht zur 1. Dimension im System CEC zuerst die Abbauprodukte der Referenz (Front: bis knapp über die Hälfte), dann die Abbauprodukte der Inkubation, wobei die Front wieder knapp zur Hälfte der Platte gelaufen war. Die hRF-Werte wurden durch Verwendung von β -MClS vergleichbar. Die Spektren der Inkubation und der Referenz wurden nach Veresterung und Extraktion in neutralem Chloroform aufgenommen (Tab. 14).

Tabelle 14

Extinktionsmaxima und relative Peakhöhen von in Methanol unter Algenanzuchtbedingungen inkubierten PCBdme und Methylphaeophorbid. (Die Spektren wurden in neutralen CHCl_3 aufgenommen, Peakhöhe = Extinktion ; xxx nicht auswertbar)

PCBdme (Referenz)		PCBdme (Inkubation)		Phaeophorbid (Referenz)		Phaeophorbid (Inkubation)	
nm	Peakhöhe	nm	Peakhöhe	nm	Peakhöhe	nm	Peakhöhe
590	<u>0,44</u>	660	0,017	668	<u>1,410</u>	666	<u>3,750</u>
386	<u>1,16</u>	640	0,015	601	0,075	608	0,405
270	0,08	500-600	xxxxx	532	0,090	537	0,450
		402	<u>0,022</u>	500	0,225	505	0,585
		280	<u>0,080</u>	402	<u>4,560</u>	409	<u>7,965</u>
				280	0,090	312	0,270
				270		270	0,135

Inkubation von PCB in Schwefelmangelmedium

11.5. Inkubation von PCB in Schwefelmangelmedium

PCBdme (7.1.) wurde mit 6 N HCl 4⁰h hydrolysiert und in CHCl_3 extrahiert. Nach der Neutralisation der organischen Phase durch Waschen mit Wasser wurde das CHCl_3 am Rotationsverdampfer entfernt und PCB in 1 ml Methanol aufgenommen und in 50 ml Medium 40 h bei 35⁰ C, 30 000 Lux und durchblubbern von Luft in sterilen Waschflaschen (vgl. 114.) bis zur völligen Entfärbung der Lösung inkubiert. Die Extraktion mit Butanol und die Veresterung erfolgte wie für das Medium beschrieben; die Analyse erfolgte mittels der 2-dimensionalen DC. Als Nullprobe diente nach der Hydrolyse erneut verestertes PCB, das in der 2-dimensionalen DC keine größeren Mengen an Beimengungen enthielt.

Literaturverzeichnis

- Avrameas, S und T. Tendrvck 1969. Immunochemistry. 6, 33:
Cross-linking of proteins with glutaraldehyde and its use for the
preparation of immunoadsorbents
- Barbier, M., 1981, Experientia 37, 1060.: The status of blue-
green bile pigments of butterflies and their phototransformation
- Beale, S.I und Cornejo, J. 1984, Plant. Physiol, 76, 7: Enzymic
transformation of biliverdin to phycocyanobilin by extracts of the
unicellular red alga *Cyanidium caldarium*
- Benedikt, E., A. Gossauer, K. Yamaguchi, M. Miki, H.P.Köst;
1986, Veröffentlichung in Vorbereitung
- Beltrame, P.L., D. Monti, R. Sala, P. Manitto, 1985, Gazz. Chim.
Ital. 115, 223 : Addition of 2-Mercaptopropionylglycin to biliver-
din. A kinetic and thermodynamic study
- Bennet, A. and H.W. Siegelmann, 1979. in The Porphyrins, Vol. VI,
The bile pigments of plants, S. 493
- Beuhler, R.J., R.C. Pierce, L. Friedman and H.W. Siegelmann,
1976, J.Biol. Chem., 251, 2405: Cleavage of Phycocyanobilin from
C-phycocyanin
- Bishop, J.E., J. Lagarias, J.V. Nagy, R.W. Schoenleber, H.Rapo-
port, A.V.Klotz, A.W. Glazer, 1986, J.BiolChem., 261, 6790:
Phycobiliprotein-Bilin linkages diversity: I. structural studie
on A- and D-ring-linked phycocyanobilins.
- Blauer, G and G. Wagniere, 1975, J. Amer.Chem. Soc. 97, 1949.:
Conformation of Bilirubin and Biliverdin in their Complexes
with Serumalbumin
- Bogorad, L. 1975, Ann. Rev. Plant. Physiol., 26, 369.: Phyco-
biliproteins and complementary chromic adaptation.
- Bonnett, R., A.A. Charalambides, K. Jones, I. Magnus and R.J.
Ridge, 1978, Biochem. J. 173, 693.: The direct determination of
Porphyrin Carboxylic Acids.
- Bois-Choussy, M. and M. Barbier, 1983 , Tetrahedron, 39, 1915.:
Photooxidation and photoprotection in the IX bile pigment series.
A comparison of the photoprotective roles of pterobilin, phorca-
bilin and sarpedobilin in vitro
- Bois-Choussy, M. Barbier, 1983, Arch. Biochem. Biophys. 221, 590:
The Action Spectrum and Phototransformations of Pterobilin (Bili-
verdin IX γ)
- Bosisio, A.B. Loehrbeil, C. Snyder, R.S. and P.G. Righetti, 1980
J. Chromatogr. 189, 317 : Titration curves of proteins by combined
isoelectric focusing-electrophoresis in highly porous polyacryl-
amide matrices

- Boussiba, S. und Richmond A. E., 1979, Arch. Mikrobiol. 120, 155: Isolation and Characterization of Phycocyanin from the Blue-Green Alga *Spirulina platensis*
- Brandsma, L. and J.R. Arens, 19 , Interscience Publishers, London, New York.: The chemistry of functional groups., The chemistry of the ether linkages. S. 582 f.
- Briand, J.P. S. Multer and M.H.V. van Regenmortel, 1985, J. Immunol. Meth. 78, 59: Synthetic Peptides as Antigens: Pitfalls of Conjugation methods
- Brown, A.S., G.D. Offner, M.M. Ehrhardt and R.F. Troxler, 1979, J. Biol. Chem. 254, 7893: Phycobilin-Apoprotein Linkages in the α - and β -Subunits of Phycocyanin from the Unicellular Rhodophyte, *Cyanidium caldarium*
- Brown, S.B. and J.A. Holroyd, 1984, Biochem. J. 217, 265: Biosynthesis of the chromophore of phycobiliproteins.
- Brown, S.B., J.A. Holroyd, R.F. Troxler and G.D. Offner, 1981, Biochem. J., 194, 137: Bile Pigment Synthesis in Plants: Incorporation of Haem into Phycocyanobilin and Phycobiliproteins in *Cyanidium caldarium*
- Burke, H.J., D.C. Pratt and A. Moscovitz, 1972, Biochemistry, 11, 4025: Low-temperature absorption and circular dichroism studies of phytochrome.
- Burwell, P.L., 1954, Chem. Ber., 54, 615: The cleavage of ethers
- Buttersby, A.R., McDonagh, E. and O'Carra, P. in: Porphyrins and Metalloporphyrins (Smith, K.M.) S. 61, Elsevier Scientific Publ. Com., Amsterdam-Oxford-New York, 1975
- Chae, Q and P.S. Song, 1975, J. Amer. Chem. Soc., 97, 4176: Linear Dichroic spectra and fluorescence polarisation of biliverdin
- Chapman, D.J., W.J. Cole and H.W. Siegelman, 1968, Biochim. Biophys. Acta, 153, 692: Cleavage of Phycocyanobilin from C-Phycocyanin
- Christen, R., 1973, Grundlagen der organischen Chemie, 4. Aufl., Sauerländer-Diesterweg-Salle, Aarau, Frankfurt am Main, Berlin
- Chino, H. Y. Abe and K. Takahashi, 1983, Biochim. Biophys. Acta, 748, 109: Purification and Characterization of a Biliverdin-Binding Cyanoprotein from the Locust Hemolymph
- Clotten, R, 1971, 63, 185: Porphyrins, Separation and identification by high-voltage electrophoresis. J. Chromatog.
- Cohen-Bazire, G. and Bryant, D.A., 1982, 19, 143, Oxford, Bot. Monog.: Phycobilisomes: composition and structure
- Cole, W.J., D.J. Chapman, H.W. Siegelman, 1967, J. Amer. Chem. Soc., 89, 3643: The Structure of Phycocyanobilin

- Cole, W.J., D.J. Chapman and H.W. Siegelman, 1968, *Biochemistry*, 7, 2929: Structure and Properties of Phycocyanobilin and related Bilatrienes
- Crespi, H.L., U. Smith and J.J. Katz, 1967, *Biochemistry* 6, 2395: Phycocyanobilin. Structure and Exchange Studies by Nuclear Resonance and Its mode of Attachment in Phycocyanin
- Czygan, F.C., 1968, *Arch.Mikrobiol.* 61,81: Sekundär-Carotenoide in Grünalgen. I. Chemie, Vorkommen und Faktoren, welche die Bildung dieser Polyene beeinflussen.
- Drabkin, D.C. in: *The porphyrins* (Hrs. Dolphin) I, S. 31: Selected landmarks in the history of porphyrins and their biologically functional derivatives.
- Eder, J, R. Wagemann und W. Rüdiger, 1975, *Immunochem.* 15, 315: Immunological Relationship between phycoerythrins from various blue-green algae.
- Edman, P. und A.Henschen, 1975 in *Protein Sequence Determination*, S. 232, Springer, New York
- Egelhoff, T and A. Grossman, 1983, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 80, 3339: Cytoplasmatic and Chloroplas Synthesis of Phycobilisome Polypeptides
- Faller, A., 1978, *Der Körper des Menschen*, 8. Aufl., Thieme, Stuttgart.
- Falk, J.E., E.L.B. Dresel, A. Benson and B.C. Knight, 1956, *Biochem.J.* 6387: Studies on the Biosynthesis of Blood Pigments
- Falk, H. und Grubmayr, 1977, *Angew.Chem.*, 89, 487: Ein geometrisch isomeres Bilatrien-abc. Z-E-Isomerisierung von Aetiobiliverdin IXy.
- Falk, H. und K. Thirring, 1980, *Tetrahedron*, : Überbrückte Gallenpigmente: N₂₁-N₂₄-Methylen-aetiobiliverdin-IV und N₂₁-N₂₄-Methylen-aetiobilirubin-IV
- Fischer, H. und R. Müller, 1926, *Hoppe-Seylers Z.Physiol.Chem.* 142, 162: Zur Kenntnis der natürlichen Porphyrine XV Mitteilung. Über die Tetramethyl-Haematoporphyrinester und ihre Überführung in Ocoporphyrinester.
- Fischer, H., A. Treibs und G. Hummel, 1929, *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 185, 56: Zur Kenntnis der natürlichen Porphyrine. XXIV Mitteilung über Haematoporphyrin
- Foulds, A. and N.G. Carr, 1977, *FEMS. Microbiol.Lett.* 2, 117: A Proteolytic Enzyme degrading Phycocyanin in the Cyanobacterium *Anabaena cylindrica*
- Fu, E., L. Friedman and H.W. Siegelman, 1979, *Biochem.J.*, 179, 1: Mass-Spectral Identification and Purification of Phycoerythrobin and Phycocyanobilin

- Fuhrhop, J.H., P.K.W. Wasser, J.Subramanian and U.Schrader, 1974, Liebigs Ann. Chem, 1974, 1450: Formylbiliverdine und ihre Metallkomplexe
- Fuiita, Y und A. Hattori, 1962, J.Biochem (Tokyo) 51, 89: Preliminary Note on a New Phycocobilin Pigment Isolated from Blue-Green Algae
- Fuiita, Y. und A. Hattori, 1963, J.Gen.Appl.Microbiol (Tokyo), 9, 253: Occurence of a Purple Pigment in Phycoerythrin-rich Cells of Blue-Green Algae *Tolypothrix tenuis*
- Gantt, E., 1969, Plant. Physiol. 44, 1629: Properties and Ultrastructure of Phycoerythrin from *Porphyridium cruentum*
- Gantt, E., C.A. Lipschultz, B. Zilinskas, 1976, Biochim.Biophys. Acta, 430, 375: Further Evidence for a Phycobilisome Model from Selective Dissociation, Fluorescence Emission, Immunoprecipitation and Electron Microscopy
- Gantt, E., 1980, Intern.Rev.Cytol., 66, 45: Structure and function of Phycobilisomes: Light harvesting pigment complexes in Red and Blue-Green-Alga
- Gantt, W. and C.H. Lipschultz, 1974, Biochemistry, 13, 2960: Phycobilisomes of *Porphyridium cruentum*: Pigment analysis
- Gianazza, E., Ghillemi and P.G. Righetti, 1980, J.Biochem.Biophys.Meth. 3, 135: Iodine stain for detection of peptides after Isoelectric Focusing
- Gianazza, F.Chillemi, C. Gelfi and P.G. Righetti, 1979, J.Biochem. Biophys.Meth. 1, 237: Isoelectric Focusing of oligopeptides: Detection by specific stains
- Glazer, A.N. and S. Fang, 1973, J.Biol.Chem., 248, 663: Chromophore-content of Blue-Green Algae Phycobiliproteins
- Goodfriend, T.L., L.Levine and G.D. Fasman, 1964, Science, 144, 1344: Antibodies to bradykinin and angiotensin: a use of carbodiimides in immunology
- Gossauer, A., 1974: Die Chemie der Pyrrole, Springer, Berlin
- Gossauer, A. und W. Hirsch, 1974, Liebigs. Ann. Chem., 1974, 1496: Totalsynthese des racemischen Phycocyanobilins (Phycobiliverdins) sowie eines "Haemophycobiliverdins"
- Gray, C.H., A.Kulczycka and D.C. Nicholson, 1961, 2276: The chemistry of the Bile Pigments. Part IV. Spectrophotometric titration of the Bile Pigments.

Grabowsky, J. und E. Gantt, E., 1978, Photochem. Photobiol. 28, 39: Photophysical properties of Phycobiliproteins from Phycobiosomes: fluorescence lifetimes, quantitative yields and polarization spectra

Grombein, S., W. Rüdiger and H. Zimmermann, 1975: The structure of the Phytochrome chromophore in both photoreversible forms, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 356, 1709

Hardie, L.P., D.L. Balkwill and S.E. Stevens, Jr: Appl. Environ. Microbiol., 1983, 45, 999: Effects of iron starvation on the physiology of the cyanobacterium *Agmenellum quadruplicatum*

Hansen, P.E., H. Tiessen and R. Brodersen: Bilirubin acidity, titrimetric and ¹³C-NMR-studies, 1979, Acta, Chem. Scand. B 33, 281

Henkelmann, G. 1983, Diplomarbeit an der LMU/München: Quantitative Bestimmung der Fettsäurezusammensetzung von Synechococcus 6301 bei verschiedenen Wachstumsbedingungen unter Berücksichtigung anderer zellulärer Bestandteile und morphologischer Daten

Holl, A. and W. Rüdiger, 1975, J. Comp. Physiol. 98, 189:

Jen, J.J. und MacKinney, G., 1970, Photochem. Photobiol., 11, 297: On the photodecomposition of Chlorophyll in vitro: I. Reaction rates

Jen, J.J. und G. MacKinney, 1970, Photochem. Photobiol., 11, 303: On the photodecomposition of Chlorophyll in vitro: II. Intermediates and break-down products

Kabat, E.A. 1968, Structural concepts in Immunology and Immunochimistry, Holt, Rinehart and Winston Inc. Publ., New York

Klein, G., Grombein, S. und Rüdiger, W. 1977, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 358, 1077: On the linkages between chromophore and protein in Biliproteins, VI: Structure and protein linkage of the Phytochrome chromophore

Karlson, P., 1977: Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler, Thieme, Stuttgart

Klein, G. 1977, Inauguraldissertation der Universität München: Versuche zur Proteinbindung und zur Stereochemie der Chromophore in Biliproteiden und Modellverbindungen.

Klein, G. und W. Rüdiger, 1978, Liebigs Ann. Chem. 1978, 267: Über die Bindungen zwischen Chromophor und Protein in Biliproteiden V: Stereochemie von Modellimiden

Klein, G. und W. Rüdiger, 1979, Z. Naturforsch. 34c, 192: Thioether formation of Phycocyanobilin: A model reaction of Phycocyanin biosynthesis

Klotz, A.V und A.N. Glazer, 1985 J. Biol. Chem., 260, 4856
Characterization of the bilin attachment sites in R-Phycoerythrin

Korb, H. und Neupert, W., 1979, Eur.J.Biochem 91, 609: Biogenesis of Cytochrom c in *Neurospora crassa*.

Köst, H.P., 1974. Inauguraldissertation der Universität München: Strukturuntersuchungen an den Phycobiliproteiden B. Phycoerythrin aus *Porphyridium cruentum* und C-Phycocyanin aus *Anacystis nidulans*.

Köst, H.P. and E. Benedikt, 1982, Z. Naturforsch. 37c, 1057: Biliverdin IXa, intermediate and end product of Tetrapyrrole biosynthesis

Köst, H.P. und E. Köst-Reyes, 1980, Electrophoreses '79, Walter de Gruyter & Co., Berlin-New York: Removal of salts and carrier ampholytes from bileptides of low molecular weight

Köst, H.P., Rath, K, Wanner, G. und Scheer, H., 1981, Photochem. Photobiol. 34, 139: Phycobilisomes and isolated phycobiliproteins: Effect of glutardialdehyde and benzoquinone on fluorescence

Köst, H.-P. und W. Rüdiger, 1977 in: Chemistry and Physiology of Bile Pigments, Fogarty Int. Cent.Proc. 35, DHEW Publ. 77-11000: Kap. 50: Phycobilin.

Köst, H.P., W. Rüdiger, and D.J. Chapman, 1975; Liebigs Ann. Chem. 1975, 1582: Über die Bindungen zwischen Chromophore und Protein in Biliproteiden I. Abbauversuche und Spektraluntersuchungen an Biliproteiden

Köst, H.P., M. Senser and G. Wanner, 1984, Zeitschr. f. Pflanzenphysiol., 113, 231: Effect of nitrate and sulphate starvation on *Porphyridium cruentum* cells

Köst-Reyes, 1978, Dissertation, Ludwigs-Maximilian-Universität, München: Untersuchungen zur Protein-Chromophor-Bindung unter Verwendung der radioaktiven Markierung mit ³⁵S am Beispiel von B-Phycoerythrin aus *Porphyridium cruentum*

Köst-Reyes and H.-P. Köst, 1979, Eur.J.Biochem., 102, 83: The protein-chromophore bond in B-Phycoerythrin from *Porphyridium cruentum*

Köst-Reyes, E., H.P. Köst und W. Rüdiger, 1975, Liebigs Ann. Chem., 1975, 1594: Nachweis von Cystein als bindende Aminosäure in B-Phycoerythrin

Krauss, C und Scheer, H, 1981, Photochem. Photobiol. 34, 385: Studies on plant bile pigments 9. Photooxidation of A-Dihydrobilindion as phytochrome model in acid medium

Kufer, W. 1980, Dissertation, Ludwigs-Maximilian Universität, München: Untersuchungen zur Protein-Chromophor-Wechselwirkung in Biliproteinen: Reversible Denaturierung und Darstellung und Charakterisierung von Biliproteiden mit chemisch modifizierten Chromophoren

Kufer, W., Cmiel, E., Thümmel, F., Rüdiger, W., Schneider, S. und Scheer, H., 1982, Photochem. Photobiol. 36, 603: Studies on plant bile pigments II. Regioselective photochemical and acid catalysed Z,E isomerization of Dihydrobilindione as phytochrome model.

Lagarias, J.C., A.N. Glazer and H. Rapoport, 1979, J. Amer. Chem. Soc., 101, 5030: Chromopeptides from C-Phycocyanin. Structure and linkage of a Phycocyanobilin bound to the β -subunit

Landsteiner, K. 1944: The specificity of serological reactions Harward Univ. Press. Cambridge, Mass.

Laycock, M.V. and J.L.C. Wright, 1981, Phytochemistry, 20, 1265: The biosynthesis of Phycocyanobilin in *Anacystis nidulans*

Lee, J.J., L.H. Daly and M.L. Cowger, 1974, Res. Comm. Chem. Pathol. Pharmacol, 9, 763: Bilirubin ionic equilibria: their effects on spectra and on conformation

Lehninger, A.L., 1979, Biochemie, 2. Aufl., Verlag Chemie, Weinheim, New York

Lundell, D.J., A.N. Glazer, R.J. DeLange und D.M. Brown, 1984, J. Biol. Chem, 259, 5472: Bilin attachment sites in the α - and β -subunits of B-Phycocerythrin

Manitto P. und D. Monti, 1979, Experientia 35, 1418: Addition of sulphydryl groups to biliverdin

Manitto, P. and D. Monti, 1973, Experientia 29, 137: Acid-catalyzed addition of alcohols and thiols to bilirubin

Merrifield, R.B., 1964, Biochemistry 3, 1385: Solid-phase peptide syntheses III. An improved synthesis of bradykinin.

Metzger, H. L. Wofsy and S.J. Singer, 1963, Arch. Biochem. Biophys. 103, 206: a Specific antibody-hapten reaction with novel spectral properties

Migdley, R. and M.R. Hepburn, 1980: Methods of Enzymologie, 70 266 Use of the double-antibody-method to separate antibodies bound from free ligand in radioimmunoassay

Minden, P., Farr, R.S. and Trembath J., 1975, Immunochemistry, 12, 477: Some variable controls for accurate heterologous anti immunoglobulin (HAI) tests

Mohr, H. Pflanzenphysiologie, Springer, Berlin

Muckle, G. Otto, J. und Rüdiger, W., 1978, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 359, 345: On the linkages between chromophor and protein in biliproteins, VII. Amino acid sequence in the chromophore regions of C-Phycocerythrin from Pseudanabaena 1173 and Phormidium persicinum

Muckle G. und W. Rüdiger, 1977, Z.Naturforsch. 32 c,957: Chromophor-content of C-Phycocerythrin from various cyanobacteria

Nagy, J.O., J.E.Bishop, A.V.Klotz, A.N. Glazer and H.Rapoport, 1985, J.Biol.Chem., 260, 4864: Bilin Attachment sites in the α , β und γ subunits of R-Phycocerythrin. Structural studies on singly and doubly linked phycocourobilins

O'Carra, P., R.F. Murphy and S.D. Killilea, 1980, Biochem.J., 187, 303: the native forms of the phycobilin chromophores of algal biliproteins

O'Carra, P. and O'hEocha, C. 1976 in: Chemistry and Biochemistry of plant pigments (T.W. Goodwin), s. 328, Acad press.

O'Carra, C. O'hEocha, 1966, Phytochemistry 5, 993: Bilins released from algae and biliproteins by methanolic extraction

O'Carra, C. O'hEocha and D.M. Carroll, 1964, Biochemistry, 3, 1343: Spectral properties of the phycobilins II: Phycocerythrobilin

O'hEocha, C., 1963, Biochemistry, 2, 375: Spectral properties of the phycobilins I: Phycocyanobilin

Ogata, T., N. Fustani and K. Yamaguchi, 1979, Comp.Biochem.Physiol. 63B, 239: Turboverdin, a new bile pigment from a turban shell, Turbo cornutus

Oshio, Y., and E. Hase, 1969, Plant Cell. Physiol. 10, 41: Studies on red pigments excreted by cells of Chlorella protothecoides during the process of bleaching induced by glucose or acetate. 1. Chemical properties of the red pigments.

Ouchterlony, O., 1949, Acta Pathol.Microbio.Scand, 26, 507: Antigen-Antibody reactions in gels

Petrier, C., 1978, Dissertation Université Scientifique et Médicale de Grenoble, Frankreich, Etude photophysique de biliverdines & neobiliverdines

Richter, G. 1976, Stoffwechselphysiologie der Pflanzen, Thieme, Stuttgart

- Righetti, P.G., Krishnamoorthy, R., Gianazza, E. and Labie, D, 1978, J. Chromatogr. 166, 455: Protein titration curves by combined isoelectric focusing electrophoresis with hemoglobin mutants as models
- Righetti, P.G., M. Menozzi, E. Gianazza and L. Valentini, 1979, FEBS Letters, 101, 51: Proteolytic equilibria of Doxorubicin as determined by isoelectric focusing and electrophoretic titration curves
- Rosengren, A., Bjellqvist, B. and Gasparic, V. 1977, in Electrofocusing and Isotachophoreses (Radola, B.J. and Graesslin, D., eds), 165. De Gruyter, Berlin:
- Rüdiger, W., 1969, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 350, 1291: Chromsäure- und Chromatabbau von Gallenfarbstoffen
- Rüdiger, W., 1967, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 348, 129: Über die Abwehrstoffe von Aplysia-Arten. I. Aplysiocyanin, ein neuartiger Gallenfarbstoff.
- Rüdiger, W., Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 1967, 348, 554: Über die Abwehrfarbstoffe von Aplysia-Arten. II. Die Struktur von Aplysiocyanin
- Rüdiger, W. 1970, Naturwiss. 57, 331: Gallenfarbstoffe bei wirbellosen Tieren
- Rüdiger, W. 1971, Fortschr. Chem. Org. Naturst. 29, 60: Gallenfarbstoffe und Biliproteide
- Rüdiger, W. 1971, Fortschr. Chem. Org. Naturst., 121, Springer - Wien: Gallenfarbstoffe und Biliproteine.
- Rüdiger, W. 1980, Phytochrome, a light receptor of plant photomorphogenesis, in: Structure and bonding, 40, 101, Springer, Berlin-Heidelberg
- Rüdiger, W. und L. Abolins, 1969, Experientia, 25, 574: Zur Bindung von Biliverdin an das Protein im Crenilabrus-Blau
- Rüdiger, W., Th. Brandlmeier, I. Blos, A. Gossauer und J.P. Weller, 1980, Z. Naturforsch. 35 c, 763: Isolation of the Phytochrome chromophore. The cleavage reaction with hydrogen bromide.
- Rüdiger, W., W. Klose, M. Vuillaume und M. Marbier 1968, Experientia 24, 1000, On the structure of pterobilin, the blue pigment of *Pieris brassicae*
- Rüdiger, W., P. O'Carra and C. O'hEocha, 1967, Nature, London 215, 1477: Structure of phycoerythrobilin and phycocyanobilin
- Sepp, E. 1981, Diplomarbeit, Ludwigs-Maximilian-Universität, München: Immunochemische Untersuchungen an B-Phycoerythrin
- Sepp, E., G. Wanner, J. Eder und H.P. Köst 1982, Z. Naturforsch. 37c, 1146: Immunochemical characterization of Porphyrinidium cruentum B-Phycoerythrin. Proof of cross-reaction between chromophore-free apoprotein and holoprotein-specific antibodies
- Siegelman, H.W., D.J. Chapman and W.J. Cole, Enzymatic cleavage of phycocyanobilin, 1967 Arch. Biochem. Biophys., 122, 261

- Szalontai, B. und Csatorday, 1979, Biochem.Biophys.Res. Com., 88, 1294: Changes in Phycocyanin-Carotenoid association during nitrate starvation of *Anacystis nidulans*
- Scharnagel, C., Köst-Reyes, E. S. Schneider, H.P. Köst und H. Scheer, Z. Naturforsch. 38c, 951: Circular dichroism of chromopeptides from phycocyanin
- Scheer, H., 1976, Z. Naturforsch. 31 c, 413: Studies on plant bile pigments: Characterization of a model for the phytochrom P_r -chromophor
- Scheer, H., 1981, Angew. Chem, 93, 230: Biliproteine
- Scheer, H., H. Formanek und S. Schneider, 1982, Photochem. Photobiol. 36, 259: Theoretical studies of biliprotein chromophores and related bile pigments by molecular orbital and ramachandran type calculations
- Schirmer, T., W. Bode, R. Huber, W. Sidler and H. Zuber, 1985, J.Mol.Biol. 184, 257: X-ray-crystallographic structure of the light-harvesting biliprotein C-Phycocyanin from the thermophilic cyanobacterium *Mastigocladus laminosus* and its resemblance to globin structures
- Schmetterer, G. and G.A. Peschen, 1981, Biochem.Physiol. Pflanzen 176, 90: Treatments effecting reversible photobleaching and thylakoid degradation in the blue-green alga *Anacystis nidulans*
- Schmidt, A., Erdle, I., Köst, H.P., 1982, Z. Naturforsch. 37 C 870: Changes of C-phycocyanin in *Synechococcus* 6301 in relation to growth on various sulfur compounds
- Schoch, S., G. Klein, U. Linsenmeier and W. Rüdiger, 1974, Tetrahedron Letter, 28, 2465: Synthese und Reaktionen von Äthyliden-Methyl-Succinimid
- Schoch, S., G. Klein, U. Linsenmeier and W. Rüdiger, 1976, Liebig's Ann. Chem., 1976, 549: Eliminierungsreaktionen an Modellsubstanzen
- Schoenleber, R.W., Y.Kim und H.Rapoport, 1984, J.Am.Chem.Soc, 106, 2645: Relative stereochemistry of the A Ring of plant bile pigments
- Schoenleber, R.W., D.J.Lundell, A.N.Glazer und H.Rapoport, 1984, J.Biol.Chem. 259, 5481: Bilin attachment sites in the α and β subunits of B-Phycocerythrin: structural studies on a doubly peptide-linked phycocerythrobilin
- Schoenleber, R.W., D.J.Lundell, A.N.Glazer und H. Rapoport, 1984, J.Biol.Chem, 259, 5485: Bilin attachment sites in the α and β -subunit of B-Phycocerythrin. Structural studies on the singly linked phycocerythrobilins.

- Schram, B.L. und H. Kroes, 1971, Eur.J.Biochem, 19, 581: Structure of phycocyanobilin
- Schuster, A., H.P. Köst, W. Rüdiger, J. Eder, 1983, Arch. Mikrobiol. 135, 30: Investigations on the apoprotein of phycocyanin from *Cyanidium caldarium*
- Schuster, A., H.P. Köst, W. Rüdiger, J.A. Holroyd and S.B. Brown, 1983, Plant Cell Reports, 2, 85: Incorporation of Haem into phycocyanobilin in levulinic acid treated *Dyanidium aldarium*
- Stahl, E. 1967, Dünnschichtchromatographie, 2. Aufl. Springer, Berlin
- Steinmüller, K., Kaling, M., Zetsche, K, 1982. In vitro Synthese von Rhodoplastenproteinen. Jubiläumstagung Deutsche Botan. Ges. Abstrakt Nr. 261
- Steinmüller, K., Kaling, M., Zetsche, K. 1983, Planta, 159, 308: in-vitro synthesis of phycobiliproteins and ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase by non-poly-adenylated-Rna of *Cyanidium caldarium* and *Porphyridium aeruginum*
- Tartelt, 1951, Chem. Rev. 49, 1: Cleavage of the carbon-sulfur bond in divalent sulfur compounds
- Thoma, H., 1982, Diplomarbeit, Universität München: Regeneration des Cyanobakteriums *Synechococcus* 6301 nach Sulfatmangel. Protein- und Ribonukleinsäureanalyse.
- Thümmler, F. und Rüdiger, W., 1983, Tetrahedron, 39, 1943: Models for the photoreversibility of phytochrom. Z,E isomerization of chromopeptides from phycocyanin and phytochrome
- Thümmler, R. W. Rüdiger, E. Cmiel und S. Schneider, 1983, Z. Naturforsch., 38 c, 359: Chromopeptides from phytochrome and phycocyanin. NMR studies of the Pfr and Pr chromophore of phytochrome and E, Z isomeric chromophors of phycocyanin
- Thümmler, F. 1984, Disseratation, Ludwigs-Maximilian-Universität, München, Der Phytochrom-Chromophor: Chemie der Photokonversion von Phytochrom
- Troxler and L. Bogorad, 1966, Plant Physiol., 41, 491: Studies on the formation of phycocyanin, porphyrins and a blue phycobilin by wildtype and mutant strains of *Cyanidium caldarium*
- Troxler, R.F., A.S. Brown and H.P. Köst, 1978, Eur.J.Biochem. 87, 181: Quantitative Degradation of radiolabelde phycobiliproteins: Chromic acid degradation of c-Phycocyanin
- Troxler, R., P. Kelly, S.B. Brown, 1978, Biochem. J. 172, 569: Phycocyanobilin synthesis in the unicellular rhodophyte *Cyanidium caldarium*
- Troxler, R.F., A.S. Brown and S.B. Brown, 1979, Bile pigment synthesis in Plants

Wanner, G. and H.P. Köst, 1980, Protoplasma, 102, 97: Investigations on the Arrangement and fine structure of Porphyridium cruentum Phycobilisomes

Wanner, G. and H.P. Köst, 1984, Z.f.Pflanzenphysiol 113, 251: Membrane storage of the red alga Porphyridium cruentum during nitrate and sulphate starvation

Wanner, G., G. Henkelmann, A. Schmidt, and H.P. Köst, 1986, Z.f. Naturforsch., eingereicht: Nitrogen and sulfur starvation of the cyanobacterium Synechococcus 6301. An ultrastructural, morphometrical and biochemical comparison

Wehrmeyer, W., und H. Schneider, 1975, Biochem.Physiol. Pflanzen, 168, 519: Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur reversiblen Veränderung der Chloroplastenstruktur von Rhodella violaceae bei Stickstoffmangel

Weller, J.P. and A. Gossauer, 1980, Chem.Ber. 113, 1603: Synthese und Photoisomerisierung des racemischen Phytychromobilin-dimethylesters

Williams, D.H. und I. Fleming, 1985, Strukturaufklärung in der organischen Chemie, Thieme, Stuttgart

With, T.K. Scand.J. Clinical Laboratory Investigations, 1958, 10, 186: The binding of porphyrins to serum proteins. A paper-electrophoretic study

Wood, N.B. Haselkorn, R. 1980, J. Bacteriol., 141, 1375: Control of phycobiliprotein proteolysis and heterocyst differentiation in Anabaena

Yagi, Y, P. Maier, D. Pressman, 1962, J. Immunol. 89, 737: Immuno-electrophoretic identification of Guinea pig anti-Insulin antibodies

Yamaguchi, K, K. Kubo, K. Hashimoto and F. Matsuura, 1977, Experientia 33, 583: Linkages between chromophore and apoprotein in the biliverdin-protein of the scales of big blue parrotfish, Scarus gibbus Rüppell

Yamanaka, G, Glazer, A.N., Williams, R.C., 1978, J.Biol.Chem.22, 8303, Cyanobacterial Phycobilisomes. Characterization of the Phycobilisomes of Synechococcus 6301

Lebenslauf

4.8.1957	Geburt in Passau
1963 - 1967	Besuch der St.-Anton-Volksschule in Passau
1967 - 1976	Besuch des Gymnasiums Leopoldinum (Neuspr. Zweig) in Passau
Juni 1976	Abitur
WS 1976	Beginn des Studiums für Biologie an der Ludwig-Maximilians-Univer- sität München
1980-4-1981	Diplomarbeit am Botanischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität (Lehrstuhl für Phytochemie)
1981	Diplom-Hauptprüfung in Biologie
1982	Beginn der Dissertation am Botanischen Institut der Ludwig-Maximilians-Uni- versität (Lehrstuhl für Phytochemie) unter der Leitung von Privatdozent Dr. habil. H.-p. Köst
3.9.1982	Heirat mit Herrn Michael Schropp
18.4.1983	Geburt der Tochter Judith

